

Melissopalinologia: il metodo Louveaux su un campione di mieli nella regione Marche e il loro potenziale allergenico

Dott.ssa Nadia Trobiani e Dott.ssa Silvia Bartolacci
Agenzia Regionale Per la Protezione Ambientale delle Marche - ARPAM

Abstract

La ricerca nasce dall'interesse per lo studio del polline contenuto nei vari campioni di miele analizzati per identificarne l'origine geografica e botanica e per valutare il suo potenziale allergenico. Con il metodo Louveaux, il contenuto di polline deve essere osservato al microscopio utilizzando la stessa procedura dell'analisi aerobiologica descritta nelle norme europee.

Dall'osservazione microscopica dei grani pollinici è possibile individuare le piante che li hanno prodotti, risalendo così ad un particolare tipo di vegetazione che contraddistingue la zona di produzione. I valori percentuali per il polline delle piante nettarifere identificati sono stati calcolati per stabilire classi di frequenza e specie dominanti. A partire da un'analisi esplorativa, i risultati ottenuti con la melissopalinologia forniscono valutazioni che, combinate con analisi sensoriale e fisica, rappresentano uno strumento di controllo utile per affrontare la tendenza crescente di frode. Confrontando le percentuali dei taxa pollinici contenuti nel miele analizzato con quelle riportate nelle schede di caratterizzazione, è stato possibile verificare la conformità all'origine botanica dichiarata. I campioni sono stati analizzati in doppio per ridurre l'incertezza dell'operatore e per garantire l'identificazione del maggior numero di specie/famiglie presenti e il riconoscimento delle famiglie botaniche. I risultati hanno fornito un quadro chiaro di una prima valutazione della conformità dei valori di riferimento; in generale, la maggior parte dei campioni esaminati, sia quelli prelevati sul mercato che quelli dei produttori locali, sono in linea con i dati ottenuti. Ricerche bibliografiche sulle allergie crociate legate alla presenza di polline nel miele hanno stabilito che le forme allergiche al miele sono ancora una condizione rara e l'incidenza non supera lo 0,001%. Studiando i pochi casi riportati in tutto il mondo, è difficile dire che le proteine del polline siano le uniche e direttamente responsabili delle manifestazioni allergiche a seguito dell'ingestione di miele; tuttavia, se volessimo attribuire la responsabilità, potremmo riferirci in particolare ai pollini Compositae, come l'artemisia, l'ambrosia e il tarassaco. Questo lavoro, pur identificando molti possibili inneschi per le reazioni allergiche, ha rilevato un numero molto basso di casi di ingestione di miele; pertanto, lo studio può essere un punto di partenza per indagarne il suo potenziale allergenico.

Introduzione

Questa ricerca parte dall'idea di studiare il polline contenuto nei vari campioni di miele analizzati nei laboratori dell'Agenzia per la Protezione Ambientale delle Marche (ARPAM) [1-3]. Il miele è un prodotto strettamente legato all'area di produzione; pertanto, la ricerca ha lo scopo di esplorare la

complessità della natura microscopica del polline e di studiarne le caratteristiche di composizione poiché derivano principalmente dal tipo di flora foraggera.

La melissopalinoologia è un ramo della palinologia che studia il polline e altri elementi microscopici che compongono il sedimento del miele; questa analisi è stata sviluppata con lo scopo di determinare l'origine botanica e geografica del miele, visto che esso contiene al suo interno il certificato di origine [4-8].

Le caratteristiche morfologiche del polline, contenute nel miele, fungono da punto di partenza per l'identificazione dei taxa di origine, utili per risalire alle relazioni filogenetiche tra miele e piante.

Mentre le api raccolgono il nettare dai fiori, inconsapevolmente diventano vettori di granelli di polline, che finiranno nel miele. Il polline arriva così nel miele trasportato dalle api, che garantisce l'impollinazione incrociata di piante lontane, favorendo così la miscelazione genetica, essenziale per la sopravvivenza e il rafforzamento della specie. Il polline ha un altro ruolo fondamentale per le api: costituisce l'unica fonte proteica per loro nutrimento. La composizione e le caratteristiche organolettiche del miele derivano principalmente dal tipo di flora che si raccoglie; oltre ai cambiamenti vegetativi, altri elementi legati al territorio influiscono sulle caratteristiche del prodotto: il tipo di suolo, lo sviluppo di diverse attività umane con i possibili effetti negativi sulla salute del prodotto (inquinamento).

Materiali e metodi

Il metodo di Louveaux è stato utilizzato esteso nel contesto della definizione dell'origine botanica, perché lo spettro pollinico del campione riflette la situazione floristica del luogo in cui è stato prodotto e riguarda essenzialmente le fasi di aggiunta di acqua e di centrifugazione, che nel complesso portano alla totale dissoluzione ed eliminazione degli zuccheri. Il contenuto di polline è stato osservato al microscopio utilizzando la stessa procedura dell'analisi aerobiologica descritta nelle norme nazionali ed europee (UNI 11299 - 2008). Anche se questa disciplina è ancora all'attenzione di alcuni esperti, nel nostro caso abbiamo cercato di ottenere dati che potessero fornire informazioni utili per verificare il rispetto dell'origine botanica dichiarata in etichetta per il miele prelevato sul mercato o dichiarato dai produttori locali dei nostri 24 campioni sottoposti ad analisi (23 di miele di nettare e 1 di melata). Fondamentale è la presenza di un confronto Palinoteca, che è una raccolta di vetrini dopo la raccolta di polline fresco, prelevato da piante di certo catione identificativo [9-11].

Per alcuni granuli il genere è stato determinato, per altri solo la famiglia a cui appartengono; i dati ottenuti sono stati riassunti in diagrammi che hanno permesso di seguire lo sviluppo qualitativo e quantitativo degli elementi vegetali in ciascun miele studiato. Dall'osservazione microscopica dei grani pollinici è possibile individuare le piante che li hanno prodotti, risalendo così ad un particolare tipo di vegetazione e, di conseguenza, alla zona di produzione.

Per determinare le classi di frequenza, sono stati calcolati solo i valori percentuali del polline identificato per le piante nettariifere, poiché è essenzialmente il loro contributo che conferisce al miele una precisa identità in termini di origine botanica. Sono state effettuate ricerche bibliografiche sul potenziale allergenico del miele in quanto si sono verificate manifestazioni allergiche dopo l'ingestione per valutare se la presenza specifica di polline nel miele debba essere considerata un fattore di rischio per le allergie alimentari al miele per soggetti atopici [12-14].

Risultati e discussioni

Il contributo che l'analisi melissopalinoologica potrebbe dare al miele italiano è quello di conoscere i prodotti nazionali più accuratamente della remota immagine con cui è rappresentata la flora delle api di altri paesi. Il lavoro di diversi ricercatori ha permesso di mappare le principali produzioni nazionali; questo è essenziale per verificare la veridicità delle indicazioni territoriali volontarie, ma anche per interpretare gli spettri del miele in cui è richiesta solo la valutazione dell'origine nazionale. Infatti, nell'interpretazione di uno spettro di polline, vengono usate tutte le armi disponibili, non solo le definizioni positive ma anche quelle di esclusione. Confrontando le percentuali dei taxa pollinici contenuti nel miele analizzato con quelle riportate nelle schede di caratterizzazione, è stato possibile verificare la corrispondenza o meno dei campioni alle loro origini botaniche. I campioni sono stati analizzati in doppio per ridurre l'incertezza dell'operatore e per garantire l'identificazione del maggior numero di specie/famiglie presenti e il riconoscimento delle famiglie botaniche. I risultati hanno fornito un quadro abbastanza chiaro di una prima valutazione della conformità dei valori di riferimento.

In generale, la maggior parte dei campioni esaminati, sia quelli prelevati sul mercato che quelli dei produttori locali, sono in linea con i dati ottenuti. I pollini trovati nei campioni riflettono la situazione floristica del luogo di produzione del miele, che è la loro origine geografica (Figure 1,2).

Alcune ricerche bibliografiche sulle allergie crociate relative alla presenza di polline nel miele hanno stabilito che le forme allergiche al miele sono ancora una condizione rara e l'incidenza non supera lo 0,001%. Studiando i pochi casi riportati, è difficile dire che le proteine del polline siano le uniche e direttamente responsabili delle manifestazioni allergiche a seguito dell'ingestione di miele; tuttavia, se volessimo attribuire la responsabilità, potremmo riferirci in particolare ai pollini Compositae, come l'artemisia, l'ambrosia e il tarassaco.

Conclusioni

Questo lavoro, pur identificando molti possibili inneschi per le reazioni allergiche, ha rilevato un numero molto basso di casi di ingestione di miele; pertanto, lo studio può essere un punto di partenza per uno studio incentrato sul potenziale allergenico del polline contenuto nel miele e sul

possibile ruolo eziologico del polline Compositae in pazienti sensibilizzati alla stessa specie, anche se la natura dell'antigene responsabile della manifestazioni allergiche causate da miele non è ancora chiaro. Sulla base dei risultati ottenuti da questo studio, la ricerca continuerà espandendo l'area di studio, al fine di creare uno spettro pollinico tipico del territorio regionale e promuovere la valutazione dell'origine botanica del miele come metodo di monitoraggio dell'agroecosistema nel tempo. In questo modo sarà possibile monitorare le specie in arrivo o perdute e infine valutare l'origine geografica del miele come garanzia per il consumatore. Finora, non è chiaro se gli allergeni siano nella saliva delle api delle ghiandole faringee o nei pollini stessi; questa ricerca continuerà a utilizzare la tecnica di immunoblotting per isolare questo allergene e chiarire la sua posizione effettiva.



Figura 1. Polline di FABACEAE *Castanea sativa* nei sedimenti di miele -Leika optical microscope 40X



Figura 2. Polline di ASTERACEAE *Heliantus* nei sedimenti di miele -Leika optical microscope 40X

Riferimenti bibliografici

1. Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. Methods of Melissopalynology. *Bee World*. 1978; 59: 139-154. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097714>
2. Louveaux J. Recherches sur la recolte du pollen par les abeilles (*Apis Mellifica* L). *Ann Abeille*. 1958; 197-221.
3. Aguiar R, Duarte FC, Mendes A, Bartolomé B, Barbosa MP. Anaphylaxis caused by honey: a case report. *Asia Pac Allergy*. 2017 Jan;7(1):48-50. doi: 10.5415/apallergy.2017.7.1.48. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28154806; PMCID: PMC5287071.
4. Bauer L, Kohlich A, Hirschwehr R, Siemann U, Ebner H, Scheiner O, Kraft D, Ebner C. Food allergy to honey: pollen or bee products? Characterization of allergenic proteins in honey by means of immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Jan; 97(1 Pt 1):65-73. doi: 10.1016/s0091-6749(96)70284-1. PMID: 8568139.
5. Helbling A, Peter C, Berchtold E, Bogdanov S, Müller U. Allergy to honey: relation to pollen and honey bee allergy. *Allergy*. 1992 Feb;47(1):41-9. doi: 10.1111/j.1398-9995.1992.tb02248.x. PMID: 590566.
6. Zhang Q, Chen X, Chen S, Ye Y, Luo J, Li J, Yu S, Liu H, Liu Z. FATAL HONEY POISONING IN SOUTHWEST CHINA: A CASE SERIES OF 31 CASES. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2017 Jan;48(1):189-96. PMID: 29644839.
7. Mukhopadhyay SK, Gupta S, Das AP, Bera S. The beekeeping potential of Sub-Himalayan West Bengal, India: A palynological assessment of honey. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 46(3): 165–180.
8. Popescu FD. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol*. 2015 Jun 26;5(2):31-50. doi: 10.5662/wjm.v5.i2.31. PMID: 26140270; PMCID: PMC4482820.
9. Von Der Ohe W, Persano Oddo L, Piana ML, Morlot M, Martin P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. 2004; 35:S18–S25.
10. Persano Oddo L, Piana ML, Ricciardelli D'Albore G. I mieli regionali italiani - Caratterizzazione melissopalinoologica. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, Roma. 2006.
11. Pucci N, Asero R, Calvani M, Indirli MC, La Grutta S. La diagnosi delle allergie alle profiline. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica*. 2011.
12. Travaglini A, Brighetti MA, Vinciguerra F. Atlante del polline delle principali specie allergeniche in Italia. Il raggio verde Edizioni. COD. 2014.
13. UNI – 11299 :2008 Analisi microscopica o Melissopalinoologica. 2008.
14. ISPRA. Linee guida per il monitoraggio aerobiologico. Manuali e Linee Guida 151/2017 ISBN 978-88-448-0820-4 – Delibera del Consiglio Federale. Seduta del 03.11.2015.Doc.n.61/15-CF.

Citation: Trobiani N, Bartolacci S (2022) Melissopalynology: The Louveaux method on honey samples in the Marche region and their allergenic potential. *Glob J Ecol* 7(2): 122-124. DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/gje.000072>