

Epreuve E7-2

**Identification des pollens  
dans le miel par  
coloration et observation  
au microscope optique**

**M58**

Julie Chêne

Session 2015/2017

Partenaires : Rucher école  
Lecomte Marcel



## Fiche de synthèse

### Contexte :

Étiquetage miels monofloraux possible ? En effet, miel = matrice indépendante où l'homme ne peut contrôler son origine florale à 100 %.

Analyses polliniques identifient les plantes butinées à l'origine de la production du miel + permettent détermination de l'appellation correcte du produit commercialisé. Projet M58 porté sur le contrôle des pollens contenus dans 4 miels différents. Par méthodes de coloration de masse puis examen au microscope du miel. Les résultats seront complétés par d'autres obtenus par PCR par un autre groupe pour améliorer la quantification des pollens et confirmer nos valeurs.

Cependant l'identification des pollens est longue soit en premier lieu, le projet demande la réalisation d'une méthodologie de reconnaissance.

### Biblio. scientifique :

Le pollen est l'organe reproducteur mâle de la fleur. Il joue son rôle en étant transporté par les insectes pollinisateurs et les éléments. Il se retrouve dans le miel, substance sucrée produite par les abeilles.

### Biblio. technique :

D'après le M58 de l'année passée et l'avis de notre partenaire M.Lecomte nous avons choisi 3 colorants : Fushine de Zhiel, Vert d'iode et Safranine pour colorer les lames. Nos colorants retenus sont caractérisés de létaux. Ils réagissent avec les protéines de la paroi du pollen et marquer ainsi un contraste.

### Résultats :

Nos résultats bruts se caractérisent par des photos de pollens reconnus ou inconnus. Par la suite nous avons élaborés nos résultats sous forme de diagramme pour en conclure le pourcentage de pollens présents dans un miel. Il est est conclu que pour un miel dis monofloral sa composition repose majoritairement sur le pollen de son appellation. En comparant nos résultats à ceux obtenus par PCR nous pouvons confirmer nos résultats. Cependant les données obtenues par PCR ne sont pas représentatives de la totalités des pollens présents dans le miel.

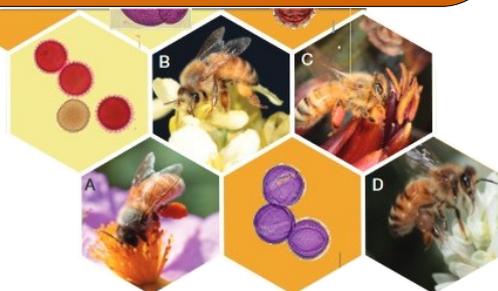
### Conclusion Personnelle :

Ce projet m'a permis d'enrichir mes Compétences en travail de groupe. J'ai également enrichi mes connaissances sur la fabrication du miel et sa composition. Le travail en groupe et en autonomie est une excellente expérience en ce qui concerne le milieu professionnel par la suite.

### Protocole :

- (1) diluer le miel dans de l'eau à 40°C
- (2) Centrifuger 20min. à 4000tr/min
- (3) Retirer le surnageant, remplir le tube d'eau et recommencer pendant 10min.

- (4) Vider le surnageant, mélanger le culot
- (5) Transférer une goutte Sur une lame
- (6) Déposer une goutte de colorant sur la lame et effectuer le montage
- (7) Faire un comptage sur 100 pollens par lame



# Table des matières

<i>Introduction</i> .....	1
<i>I - Bibliographie :</i> .....	2
1. Bibliographie scientifique : du miel au pollen.....	2
2. Bibliographie techniques : les colorants.....	2
3. Les partenaires.....	3
<i>II. Protocole</i> .....	4
1. Résultats attendus.....	4
2. Résultats brut obtenus :.....	5
3. Résultats élaborés et discussion.....	6
<i>IV. Conclusion</i> .....	8
<i>Annexe 1 : Budget</i> .....	9
<i>Annexe 2 : Planning</i> .....	9
<i>Annexe 3 : Bibliographie liens internet :</i> .....	10
<i>Annexe 4: tableau d'identification des pollens :</i> .....	10

## Remerciements :

Je souhaite remercier en premier lieu monsieur Marcel Lecomte, pour ses conseils sur les techniques de coloration et les colorants à favoriser pour notre projet.

Je remercie également le rucher école, miellerie, qui nous a fournis des échantillons de miel variés à analyser et des informations sur notre bibliographie scientifique.

## Introduction

De nos jours la consommation de miel augmente. Effectivement le produit attire les consommateurs pour certaines de ses vertus notamment anti-oxydantes et sa fabrication naturelle. En effet, les apiculteurs ne peuvent contrôler le trajet de leur abeilles, la création du miel se réalise sans la main de l'homme et dépend des saisons, du climat du sol mais aussi des plantes, ce qui peut alors donner différents goûts pour un miel portant le même nom selon les pays ou régions. Dans la création du miel l'homme intervient uniquement lors de la conduite de rucher, afin de favoriser la pollinisation de certains arbres par leurs abeilles, et de la récolte.

Ainsi les apiculteurs peuvent orienter leur vente sur des produits dit "mono-floraux", cette appellation permet au producteur de vendre son miel à un prix plus élevé et de mieux le caractériser dans certaines vertus, que ceux dit « toutes fleurs ».

Cependant le miel reste un des produits les plus compliqués à caractériser dans sa composition sur un étiquetage. Comment est-on certain qu'il n'y ait donc qu'une espèce de fleur dans un miel qui lui est dit spécifique sachant que l'homme ne peut intervenir dans sa création ?

Des analyses polliniques permettent de déterminer l'appellation correcte du produit commercialisé. Ces analyses identifient les plantes butinées à l'origine de la production du miel et permettent ainsi la détection des fraudes concernant l'étiquetage des produits. Cependant, il est normal de retrouver certains pollens environnants dans des miels dit mono-floraux. Malheureusement la quantification de ces autres pollens est difficile à réaliser. En effet la variété de pollen est large et certains ce ressemblent énormément. C'est pour cela que des techniques quantitatives de laboratoires plus pointues se développent tel la PCR (Polymerase Chain Reaction). Ces analyses pourront dans un futur proche permettre la détermination des certifications AOP ou AOC ou certaines appellations BIO sur certains miels, selon des normes non déterminées à ce jour.

Dans le cadre de notre projet scientifique M58, nous avons choisi de mettre en place un contrôle sur les pollens contenus dans 4 miels différents, avec un de châtaigner, de tilleul, de tournesol et de toutes fleurs. En finalité notre projet est de permettre l'étiquetage de ces miels grâce à la méthode de coloration de masse pour donner suite à un examen au microscope du miel, ce qui permettra d'en préciser son origine florale. De plus nous compléterons nos résultats avec d'autres obtenus par PCR par un autre groupe pour améliorer la quantification des pollens et confirmer nos valeurs.

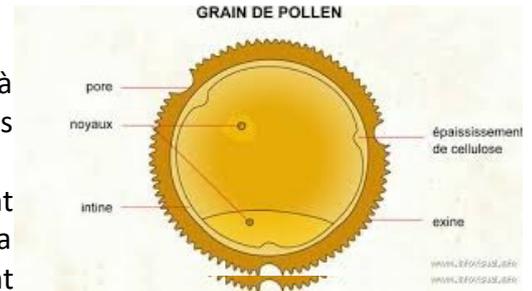
Cependant l'identification des pollens peut être longue et laborieuse, c'est pour cela que nous réaliserons en premier lieu une méthodologie de reconnaissance.

## I - Bibliographie :

### 1. Bibliographie scientifique : du miel au pollen

Le miel est une substance sucrée produite par les abeilles à partir de nectar ou de miellat. Il est constitué d'eau, de sucres (glucose, fructose..) et d'autres composants tel le pollen.

Les grains de pollens proviennent des fleurs, on les y trouvent sous forme de cellules de forme plus ou moins ronde et dont la surface mais aussi la taille varie selon les espèces. Ils effectuent ainsi un rôle d'organe reproducteur mâle. Un grain de pollen



pollen va donc servir à féconder les ovules situés dans les ovaires de la plante (voir figure 2). Un grain de pollen contrairement aux cellules, possède deux noyaux: un noyau végétatif et un noyau reproducteur.

Pour remplir son rôle, il doit être transporté par l'eau, le vent, ou les insectes pollinisateurs (comme les abeilles) sur les stigmates des fleurs. Une fois transporté, celui-ci sera hydraté par des sucres et va germer, grâce à son noyau végétatif. Un tube pollinique va se former afin de faire transiter le noyau reproducteur vers les ovules qui une fois fécondés vont dans la majeure partie des cas former une graine.

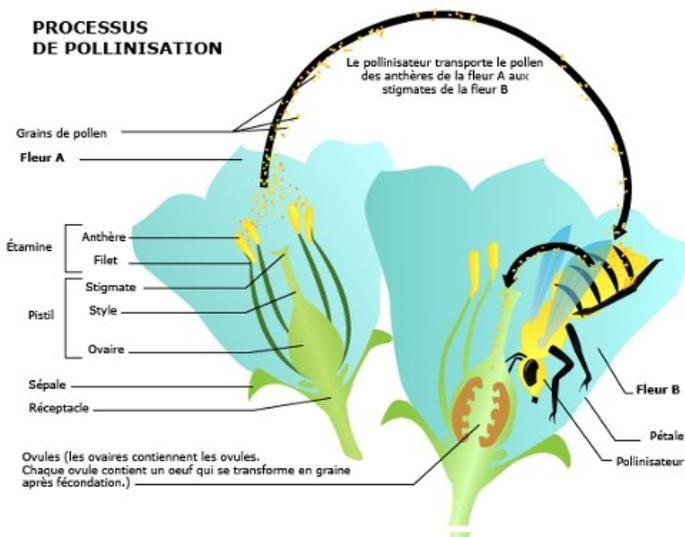


Illustration 2: processus de pollinisation

### 2. Bibliographie techniques : les colorants

Notre manipulation consiste à colorer les grains de pollens afin de mieux les identifier et les repérer au microscope. Pour cela nous nous sommes basés sur le projet M58 de 2016 qui précédait le notre. Nous avons donc retenus les trois colorants ayant le mieux fonctionné lors de leur manipulation. Il faut savoir qu'il faut utiliser ces réactifs avec précautions car ceux-ci sont toxiques par voie orale et irritant et tachant sur la peau.

On utilisera donc :

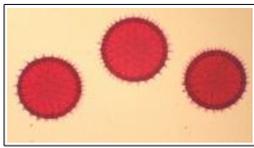
La fushine de zielh : C'est un colorant de couleur rouge/rose qui est notamment utilisé dans la coloration de gram. Les sels de cette dernière sont intéressants à cause de leur plus grande

solubilité. La fuchsine de Ziehl est aussi connue sous les noms de fuchsine phéniquée de Ziehl ou encore rouge de Ziehl.

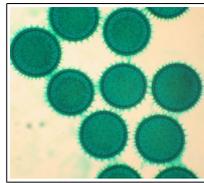
Le vert d'iode : C'est un colorant de couleur verte utilisé dans la coloration de noyau cellulaire en botanique. C'est un colorant basique qui n'existe qu'à l'état de sel car sa base est incolore. Le vert d'iode est un colorant exceptionnel en cytologie et histologie végétales, lorsqu'il est utilisé en parallèle avec le carmin aluné. Leur action combinée permet de colorer la cellulose, le liège et les parois lignifiées.

Son avantage, particulièrement marquant lors de travaux pratiques, est la simplicité d'utilisation. Son inconvénient est un vieillissement rapide surtout en montage à la glycérine gélatinée.

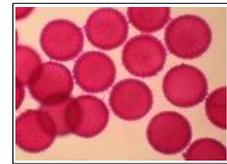
Safranine : C'est un colorant qui comme la fuchsine est utilisé principalement dans la coloration de gram, les résultats obtenus avec son similaires à ceux obtenus avec la fuchsine. Elle présente donc les mêmes caractéristiques de lectures.



Coloration à la fuchsine de Ziehl



Coloration au vert d'iode



Coloration à la Safranine

Ces colorants suivent le principe de coloration simple. La plupart des colorants existent sous forme de sel. En solution aqueuse ce sel va s'ioniser et produire un cation  $X^+$  et un anion  $Y^-$ . Les colorants dits « acides » vont être spécifiques des zones cytoplasmiques et donc anioniques et ceux dits « basiques » des zones nucléaires et donc cationiques. Les colorants neutres comportent donc des cationiques et anioniques et colorent la totalité de la structure. Dans notre cas, parler de colorants acides ou basiques n'est pas adapté. Nous parlerons plutôt de colorants vitaux et létaux. La coloration vitale consiste à soumettre un organisme vivant à l'action d'un colorant spécifique, très dilué de l'ordre du 1/1.000ème au 1/10.000ème. Il va alors se fixer sur les éléments à observer, sans altérer les fonctions vitales, essentiellement à court terme. Ces colorants sont rares (ex : éosine, rouge neutre...). Les colorants létaux eux, sont à concentration nettement plus élevée (de 0.5 à 10 %), et leur solvant peut être l'eau, l'alcool, l'ammoniac, l'isopropanol. Ils colorent certains éléments de la cellule par des réactions chimiques spécifiques avec certains composants, tel les protéines, les acides aminés, les lipides ou encore les acides nucléiques. De nos jours certains colorants existent en étant spécifiques à certaines protéines, cela peut donc permettre de mettre en évidence tel ou tel constituant au moment de la coloration. (D'après A. Gerault chimiste, et M. Lecomte Mycologue.)

Nos colorants retenus sont caractérisés de létaux. En effet ces derniers vont réagir avec les protéines de la paroi essentiellement et marquer ainsi un contraste distinct.

### 3. Les partenaires

Nous avons deux partenaires professionnels, Mr Piedebout, et Mr Lecomte. Mr Piedebout nous fournit les échantillons de miels via le Rucher école, miellerie. Mr Lecomte est un partenaire en bibliographie scientifique et technique. Tous ses documents sur internet (voir annexe 3 p.9) nous sont d'une utilité précieuse et de plus nous sommes en contact avec lui par e-mail pour quelques questions ou problèmes rencontrés lors des protocoles ou principes.

## II. Protocole



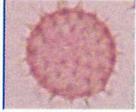
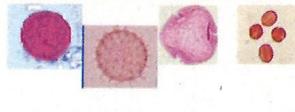
Étapes du protocoles	Rôles des étapes	Précautions de manipulation
-Diluer environ 10g de miel dans 50ml d'eau à 40°C et attendre la dissolution du miel.	On chauffe pour aider le pollen à se séparer des composants du miel. Et utiliser directement des tubes à centrifuger de 50mL	Peser 10g de miel à 0,1g.
Centrifuger 20min à 4000 tours minutes. Vider le surnageant et diluer les culots dans 10mL d'eau distillée chaude	Ajouter 10mL d'eau distillée chaude permet de dissoudre les dernier cristaux de sucre restant. On chauffe pour aider le pollen à se séparer des composants du miel.	Utiliser des pipettes Pasteurs jetable de 1mL pour reprendre les culots et pouvoir atteindre le fond des tubes ; Utiliser des tubes de 10mL pour la centrifugation.
Centrifuger 10min à 4000tours minutes. Retirer tout le surnageant	Centrifuger permet une meilleure séparation des phases.	Ne pas se tenir face à l'automate. Prendre soin d'équilibrer les échantillons dans la centrifugeuse.
Mélanger complètement le culot à l'aide d'une pipette et transférer une goutte sur une lame	Mélanger permet d'homogénéiser pour augmenter les chances de tomber sur du pollen.	Sous les lame créer un quadrillage là ou la lamelle sera déposée afin de faciliter le comptage par la suite
Sécher le dépôt sur plaque chauffante d'histologie puis déposer une goutte de colorant	Cette étape est primordiale. Elle déterminera la lisibilité des lames par la suite et leur coloration.	Attention : Penser à étaler le dépôt pour que le séchage soit plus rapide.
Réaliser un montage lame lamelle puis observer au microscope les différents pollens (grossissement x100)	Cette étape est la plus longue, c'est celle de l'identification elle nous permettra de faire notre diagnostique.	Déposer la lamelle sur la lame très lentement pour éviter les bulles d'air.
Réaliser un comptage sur 100 pollens pour obtenir une analyse quantitative.	Permet par la suite d'interpréter nos résultats.	

**Remarque :** Il est préférable de laisser les lames pendant 12 à 24h pour que les colorants prennent bien dans les pollens. Nous avons réduit le choix à 3 colorants suite au protocoles recherchés et à celui proposé par le groupe de M58 de 2016 . Ceux-ci sont la fuschine de Ziehl, le vert d'iode et la safranine.

## III. Résultats:

### 1. Résultats attendus

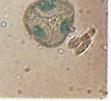
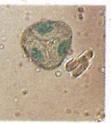
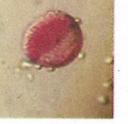
D'après le tableau d'identification réalisé par notre groupe (Annexe 4) nous nous attendons à

Miel Châtaigner	Miel Tournesol	Miel Tilleul	Miel Toute fleurs
			

retrouver les pollens suivants en majorité dans chaque miels.

**2. Résultats brut obtenus :**

Après observation au microscope optique à un grossissement x100 nous avons effectué plusieurs photos au smartphone afin d'obtenir les résultats bruts suivants. Nous avons réalisés nos colorations sur un ensemble de 39 tubes (10 de Tournesol, 11 de Toutes fleurs, 9 de Châtaigner et 9 de Tilleul). Nous avons réalisé 3 colorations par tubes, soit un total de 117 lames à la lecture.

Pollens :	Chataigner	Tournesol	Tilleul	Autres	Inconnu
<b>Miel toute fleur</b>				 Genet  ambrosie  peuplier  érable  lavande  acacia	  
<b>Miel châtaigner</b>				 Lierre  érable  peuplier  aubépine	 
<b>Miel Tilleul</b>		Aucun reconnu		 Genet  Sapin  peuplier	 
<b>Miel Tournesol</b>				 Acacia  Noisetier  Genet  Frêne  Chêne	  

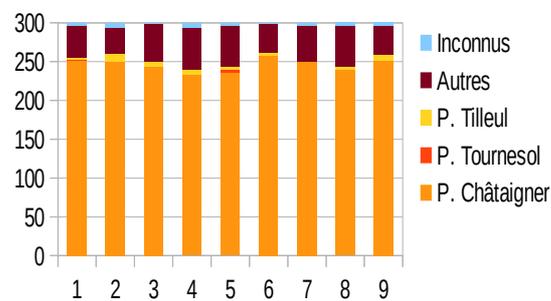
Ces résultats bruts obtenus nous ont permis de valider nos colorants et nos dilutions. En effet nous avons dilué 10µL de colorant dans 1mL d'eau distillée afin d'obtenir les clichés précédents. Lors de nos comptages les dilutions étaient moindres : 5µL dans 1mL. Nous nous sommes vite rendu compte que les colorations étaient suffisantes pour un comptage à l'oeil nu mais ne se voyaient pas sur nos clichés.

Après observation au microscope optique, nous en concluons que sur les trois colorants retenus la Safranine et le vert d'iode sont les deux colorants les plus marquant. En effet les couleurs sont prononcées et les contrastes entre les parois et le noyau sont plus distinctes et permettent donc mieux la reconnaissance de deux pollens similaires tel le chêne ou l'érable ou bien l'aubépine du tilleul.

### 3. Résultats élaborés et discussion

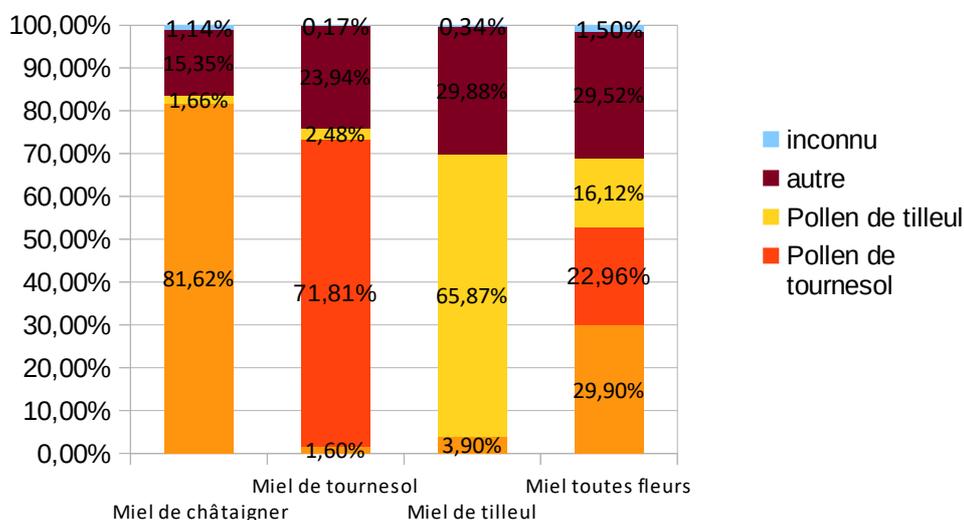
Ci-contre nous pouvons observer un exemple de diagramme établi après comptage des lames pour un miel. Ici nous avons 9 tubes à analyser soit 27 lames à lire pour le miel de châtaigner. On observe que le taux de pollen de l'appellation du miel est en quantité très importante soit dans les environs de 250/300 pour les 3 colorations réunies. Le pourcentage de tournesol et de tilleul est très faible contrairement au pollens de « autres » où on retrouve majoritairement de l'érable, de l'aubépine, du genêt et beaucoup de peuplier. Ces pollens proviennent de floraisons s'étalant d'avril à août tout en restant centré sur une période principale de mai. On peut donc valider ces reconnaissances en y ajoutant le facteur floraison. Contrairement au M58 porté sur la coloration de l'an dernier le pourcentage d'inconnus est très faible. Afin de prendre plus ample conscience de nos résultats, observons les pourcentages obtenus pour la totalité des miels, et ce dans pour l'ensemble des lames.

Diagramme représentatif du comptage effectué sur le miel de châtaigner



On observe que le taux de pollen de l'appellation du miel est en quantité très importante soit dans les environs de 250/300 pour les 3 colorations réunies. Le pourcentage de tournesol et de tilleul est très faible contrairement au pollens de « autres » où on retrouve majoritairement de l'érable, de l'aubépine, du genêt et beaucoup de peuplier. Ces pollens proviennent de floraisons s'étalant d'avril à août tout en restant centré sur une période principale de mai. On peut donc valider ces reconnaissances en y ajoutant le facteur floraison. Contrairement au M58 porté sur la coloration de l'an dernier le pourcentage d'inconnus est très faible. Afin de prendre plus ample conscience de nos résultats, observons les pourcentages obtenus pour la totalité des miels, et ce dans pour l'ensemble des lames.

Diagramme récapitulatif de la composition des quatre miels étudiés



Le diagramme ci-dessus représente nos résultats bruts de façon élaboré et nous indique en premier lieu sur la composition majoritaire de chacun des miels.

En effet on observe que le miel dis de châtaigner est composé d'après nos comptages à 81.62 % de pollen de châtaigner ; le miel dis de tournesol est composé à 71.81 % de pollen de tournesol et le miel dis de tilleul est composé à 65.87 % de pollen de tilleul. Quant au miel de toutes fleurs, ce dernier est composé majoritairement des trois pollens recherchés au préalable.

En analysant ces résultats de plus près on peut dire que ceux du miel de tilleul sont peu représentatif car lors de notre comptage, très peu de pollen étaient lisible, les effectifs se sont donc fait sur moins de 300 pollens pour 3 lames.

Une autre remarque qui attire le regard sur ce diagramme, est le fait qu'il y est un pourcentage d'inconnu extrêmement bas si nous comparons nos résultats à ceux du M58 coloration effectué en 2016. Ceci s'explique par la réalisation d'une table de reconnaissance des pollens, disponible en annexe 4 et par le choix de colorants et de dilutions, effectués d'une part les résultats obtenus en 2016 et d'autre part, grâce aux conseils de M. Lecomte. En effet ces réalisations nous on permis de minimiser le pourcentage d'erreur et d'inconnu en accroissant en revanche pour chacun des miels, le pourcentage de pollens « autres » compris entre 15 et 30 %.

Toute fois similairement au groupe M58 de l'année 2016 nous pouvons en conclure que les miels monofloraux de châtaigner, tieuil et tournesol sont effectivement composés majoritairement de pollens de leur appellation. Ceci conforme donc l'étiquetage et peut rassurer le consommateur.

Nous avons donc ainsi pu obtenir des résultats par une méthode usuelle, pour ne pas dire de référence. Cette quantification est fidélisée par l'utilisation de 3 colorants létaux efficaces et correctement dilués, ce qui nous permet de partir avec un minimum de pourcentage d'erreur. De plus la réalisation d'un tableau de reconnaissance (Annexe 4) nous à permis de réduire considérablement le nombre de pollen inconnus dans le comptage de nos lames.

En conclusion les miels de châtaigner, tournesol et tilleul analysés confirment leur étiquetage monofloral de part leur composition. En effet chacun d'entre eux à pour majorité du pollen provenant de son appellation : 81 % pour le châtaigner, 72 % pour le tournesol et 66 % pour le tilleul. Cependant n'ayant pas une connaissance experte sur la reconnaissance des pollens, un pourcentage d'erreur d'interprétation est en prendre en compte dans nos résultats. En effet bon nombres de pollens se ressemblent et de plus l'erreur humaine et la fatigue visuelle peuvent être des facteurs influant dans nos données.

Pour remédier à cela un deuxième groupe M58 à travaillé en parallèle sur la quantification de pollen dans un miel mais la technique PCR en amplifiant l'ADN présent dans le pollen. Pour cela, ce groupe a utilisé des amorces spécifiques au pollen de châtaigner, tilleul et tournesol. Leur résultats ont des points de ressemblance avec les notre mais divergent sur certains points. En effet après amplification de l'ADN elles trouvent :

	Miel de tournesol	Miel de châtaigner	Miel de Tilleul
Pollen Tournesol	16%	16%	18%
Pollen Châtaigner	32%	34%	35%
Pollen Tilleul	35%	45%	36%

Rq: pour le miel de toute fleur leur résultats concordent parfaitement avec ceux que nous avons obtenus par comptage de lames.

Leurs résultats obtenus sont obtenus par défauts et peu représentatifs de la quantité de pollen dans un miel. En effet l'ADN de pollen de châtaigner, tournesol et tilleul sont amplifié mais

le pourcentage de pollens autres n'apparaît pas. Les amorces utilisées ne sont peut être pas représentatives de la variétés de pollens présents dans le miel et restent très spécifiques. Cependant la conclusion finale est la même avec les deux techniques, les miels correspondent à leur appellation.

Si l'on souhaite améliorer notre technique d'identification afin de limiter l'erreur humaine, nous pourrions utiliser la classification constituée en 1964 par K.Faegri et J. Iversen, qui permet de reconnaître les différents pollens à l'aide de leur morphologie.

Cela permettra ainsi de réduire le risque de confondre certains pollens entre eux.



Illustration 3: Extrait de la classification par K.Faegri et J. Iversen ; issue de banque des savoirs

#### IV. Conclusion

Tout d'abord il faut savoir que le point critique de notre projet repose sur la matrice. En effet cette dernière, le miel, est non répétable ni reproductible de par le fait qu'elle dépend uniquement de l'animal, mais également de la géographie, la météo et de la sédentarité ou non réalisée par l'apiculteur.

Les études M58 menées en 2016 furent une bonne indication de départ pour lancer nos analyses et interpréter nos résultats. Grâce à cela et aux indications de nos partenaires une grande tendance ce dégage de nos résultats, de ceux de l'année 2016 et de ceux obtenus par le groupe utilisant la méthode PCR. Les miels dit monofloraux de tilleul, châtaigner et tournesol correspondent à leur étiquetage de part la présence majoritaire de pollens issus de leur appellation.

En effet chacune des méthodes utilisées comporte des inconvénients au niveau du principe ou bien du protocole, cependant la méthode usuelle utilisée reste une des méthodes les plus quantitative et à la fois représentative de l'ensemble des pollens constituant un miel. Afin de se rendre compte de la quantité exacte de pollens appartenant à l'appellation du miel ou bien à l'inverse de la quantité autres présente, un M58 supplémentaire sur la polarisation d'un seul miel et/ou d'une seule variété dans un miel serait judicieux. En effet avec l'apport des résultats primaires sur les colorants et l'estimation d'un pourcentages effectués en 2016, la réalisation d'une méthode de comptage en 2017 plus une étude approfondie sur 1 miel en 2018, cela permettra une conclusion plus précise et plus juste sur l'étiquetage des miels.

En effet, cette problématique centrale de notre projet reste légèrement flou puisque notre technique permet d'y répondre. Cependant créer un étiquetage fiable avec le pourcentage exact de chaque pollen présent dans le produit reste très délicat. En effet ce dernier dépend de la floraison annuelle et de son retard ou non, de la météo, de la géographie, de la récolte de l'apiculteur et des abeilles. Le miel pourra-t-il un jour être correctement étiqueté et ainsi rassurer les consommateurs sur sa composition ? Les techniques de coloration simple et de PCR sont alors à approfondir et à perfectionner afin de rendre l'étiquetage simple et pas trop lourd pour un produit pourtant si facile à déguster.

## Annexe 1 : Budget

Dépenses (250€ maxi)		Recettes	
Nature des dépenses	Montant	Nature des recettes	Montant
-Réactifs	1.9€	Lycée	16.8€
-Consommables	14.9€	Partenaire G. Piedebout	miels
-Miels	achat effectué en 2016		
-Fluides et énergies	10%		
<b>TOTAL DEPENSES</b>	16.8€ + 10%	<b>TOTAL RECETTES</b>	16.8€ +10%
<b>TOTAL TTC</b>	<b>19 €</b>		<b>19 €</b>
<b>DEPENSES</b>			

## Bon de commande :

Produit	Fournisseur	Référence	Quantité	Prix TTC	Prix unité TTC	Quantité pour L'analyse	Total TTC pour L'analyse
<b>CONSOMMABLES</b>							
tubes pour Centrifugeuse	VWR	525-0631	500	96,90 €	0,20 €	12	2,40 €
Embouts Micropipettes Jaunes	VWR	613-0235	1000	4,96 €	0,005 €	21	0,11 €
Embouts Micropipettes bleus	VWR	613-0342	1000	6,12 €	0,006 €	21	0,13 €
Lames	VWR	631-9113	100	10,28 €	0,10 €	72	7,20 €
Lamelles	VWR	631-1575	1000	66,04 €	0,07 €	72	5,04 €
pipettes pasteurs	VWR	612-3849	250	7,61 €	0,03 €	3	0,09 €
<b>REACTIFS</b>							
Vert d'iode	VWR	MT113	500mL	66,30 €	66,30 €	1mL	0,13 €
Safranine	VWR	ACRO419210250	25g	40,40 €	40,40 €	1g	1,62 €
Fushine de Ziehl	VWR	1.09215.0500	500mL	69,10 €	69,10 €	1mL	0,14 €
Acide acétique	Chem-Lab	0.0116.1000	1L	26,64 €	26,64 €	150mL	0,03 €
						<b>TOTAL TTC Analyse</b>	<b>16,88 €</b>

## Annexe 2 : Planning

Semaine du :	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi
<b>31/01/17</b>	/	Essai du protocole de coloration	/	/	/
<b>13/03/17</b>	Réalisation du protocole sur 2 miels	Lecture des premières lames réalisation du protocole sur 2 miels + recommencer les autres si ratés.	Lecture des lames + recommencer les autres si ratés.	Lectures des lames + rédaction et interprétation des résultats	Lectures des dernières lames + rédaction et interprétation des résultats et conclusion.
<b>Nous avons eu une première semaine divisée en demi-journées dans la période précédent la semaine de réalisation. Cela nous a permis de travailler le dossier commun et individuel.</b>					

### Annexe 3 : Bibliographie liens internet :

- Sites internet pour la réalisation de la bibliographie :

**Champignons-passion.be** : aide à la bibliographie technique des colorants

**SVT.free.fr** : aide à la bibliographie technique des colorants

**Varapiloisir.com** : aide à la bibliographie scientifique sur le pollen

**Universalis.fr** : aide à la bibliographie scientifique sur le pollen et le miel

**Youtube**, "préparer une lame de pollen à partir de miel" de ApihappyApiculture : aide à la réalisation du protocole.

**Thèse pollen**, université de Lyon 2010, pdf : aide à la réalisation du protocole.

**Le dictionnaire visuel, Banque des savoirs, Maxicours.com** : sites de récupération des illustrations.

- Sites internet pour la réalisation du tableau d'identification :

\*Pedagogie-ac-réunion, annexes académiques pdf

\*Identification des pollens pdf, académie de créteil

\*Fiche technique comptage de pollen franche-comte.org

\*Pollen pellet colour poster pdf, treesforbeesnz.org

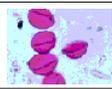
\*Microscopie.com, DOSSIERS, par Marcel Lecomte

\*Le naturaliste.net

### Annexe 4: tableau d'identification des pollens :

Tableau d'identification des pollens par coloration microscopique

Photo pollen	Nom	Photo pollen	Nom	Photo pollen	Nom
	Oseille		Châtaigner		Oranger du Mexique
	Renoncule		Bouleau		Chrysanthème
	Ambroisie		Noisetier		Genêt
	Chêne		Frêne		Pâquerette
	Armoise		Sapin		Pissenlit
	Aubépine		Colza		Hélianthème

	Tilleul		Saule		Pivoine arbustive
	Lavande		Lierre		Cerisier
	Cyprés		Pécher		Camélia
	Thym		Hêtre		Aulne
	Hébés		Bourrache		Pin
	Pavot		Convolvulus senebium		Cèdre
	Charme		Mélèze		Ortie
	Cypéracée		Droséra		Romarin
	Acacia		Tulipe		Rose trémière
	Tournefortia		Sarrasin		Olivier
	Peuplier		Ginkgo		Érable
	Copalme		Eucalyptus		Calistemon

 Pollens recherchés

 Pollens peu probables

 Pollens fort probables