

ILNAS

Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 16695:2015

Qualité de l'eau - Lignes directrices pour l'estimation du biovolume des microalgues

Wasserbeschaffenheit - Anleitung zur
Abschätzung des Phytoplankton-
Biovolumens

Water quality - Guidance on the
estimation of phytoplankton biovolume

09/2015



Avant-propos national

Cette Norme Européenne EN 16695:2015 a été adoptée comme Norme Luxembourgeoise ILNAS-EN 16695:2015.

Toute personne intéressée, membre d'une organisation basée au Luxembourg, peut participer gratuitement à l'élaboration de normes luxembourgeoises (ILNAS), européennes (CEN, CENELEC) et internationales (ISO, IEC) :

- Influencer et participer à la conception de normes
- Anticiper les développements futurs
- Participer aux réunions des comités techniques

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

CETTE PUBLICATION EST PROTÉGÉE PAR LE DROIT D'AUTEUR

Aucun contenu de la présente publication ne peut être reproduit ou utilisé sous quelque forme ou par quelque procédé que ce soit - électronique, mécanique, photocopie ou par d'autres moyens sans autorisation préalable !

ICS 13.060.70

Version Française

Qualité de l'eau - Lignes directrices pour l'estimation du biovolume des microalgues

Wasserbeschaffenheit - Anleitung zur Abschätzung des Phytoplankton-Biovolumens

Water quality - Guidance on the estimation of phytoplankton biovolume

La présente Norme européenne a été adoptée par le CEN le 10 juillet 2015.

Les membres du CEN sont tenus de se soumettre au Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, qui définit les conditions dans lesquelles doit être attribué, sans modification, le statut de norme nationale à la Norme européenne. Les listes mises à jour et les références bibliographiques relatives à ces normes nationales peuvent être obtenues auprès du Centre de Gestion du CEN-CENELEC ou auprès des membres du CEN.

La présente Norme européenne existe en trois versions officielles (allemand, anglais, français). Une version dans une autre langue faite par traduction sous la responsabilité d'un membre du CEN dans sa langue nationale et notifiée au Centre de Gestion du CEN-CENELEC, a le même statut que les versions officielles.

Les membres du CEN sont les organismes nationaux de normalisation des pays suivants: Allemagne, Ancienne République yougoslave de Macédoine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.



COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION

CEN-CENELEC Management Centre: Avenue Marnix 17, B-1000 Bruxelles

Sommaire

	Page
Avant-propos européen.....	3
Introduction	4
1 Domaine d'application	5
2 Références normatives	5
3 Termes et définitions	5
4 Principe	5
5 Matériels et conservateurs	6
6 Mode opératoire	7
6.1 Échantillonnage et préparation des échantillons	7
6.2 Étalonnage du micromètre oculaire, du graticule de comptage et du logiciel d'analyse d'images	7
6.3 Exigences statistiques pour la détermination	8
6.4 Mesure	9
6.4.1 Généralités	9
6.4.2 Utilisation de classes de taille basées sur des mesures représentatives	10
6.4.3 Manière de traiter les dimensions masquées	10
6.4.4 Mesure des taxons filamenteux	10
6.4.5 Mesure et comptage de taxons formant colonies et cénobes	11
6.4.6 Mesure des formes géométriques complexes	12
6.5 Calcul du biovolume	12
6.6 Relations entre biovolume et biomasse	13
6.7 Rapport	13
7 Assurance qualité	14
Annexe A (informative) Liste des formes géométriques	15
Annexe B (informative) Données de performance	24
Annexe C (informative) Calcul de la teneur en carbone	29
Annexe D (informative) Liste alphabétique des formes géométriques recommandées et des facteurs de dimensions masquées	32
Annexe E (informative) Exemple : Instruction pour la mesure des dimensions de taxons déterminés au genre	95
Bibliographie	99

Avant-propos européen

Le présent document (EN 16695:2015) a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 230 "Analyse de l'eau", dont le secrétariat est tenu par DIN.

Cette Norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en mars 2016, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en mars 2016.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. Le CEN et/ou le CENELEC ne saurait [sauraient] être tenu[s] pour responsable[s] de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

Le présent document a été élaboré dans le cadre d'un mandat donné au CEN par la Commission Européenne et l'Association Européenne de Libre Echange.

Selon le Règlement Intérieur du CEN-CENELEC les instituts de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette Norme européenne en application : Allemagne, Ancienne République Yougoslave de Macédoine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.

Introduction

L'abondance ou le nombre d'unités de comptage des taxons phytoplanctoniques individuels ne reflète pas nécessairement le rapport réel entre les taxons individuels et la biomasse totale d'une communauté phytoplanctonique. Quelques grosses cellules/unités de comptage peuvent contribuer de façon bien plus importante à la biomasse du système que de nombreuses petites cellules/unités de comptage. De ce fait, les données d'abondance ne constituent pas à elles seules une mesure idéale de l'effectif d'une population. Les estimations de la biomasse donnent des informations très importantes pour les études écologiques, les systèmes de classification et la modélisation des écosystèmes. Il est donc nécessaire de déterminer la biomasse des taxons phytoplanctoniques, notamment du fait que l'énergie est disponible sous forme de carbone à d'autres niveaux trophiques des réseaux trophiques. Dans la mesure où il est impossible de déterminer directement la teneur en carbone au niveau taxonomique dans des échantillons naturels de phytoplancton, le biovolume des taxons phytoplanctoniques est une mesure appropriée pour déterminer la biomasse du compartiment microalgae dans d'un écosystème, ainsi que sa composition taxonomique. Une analyse granulométrique par laser, en cytométrie de flux, avec des compteurs Coulter ou des analyses chimiques de concentration en chlorophylle-a et en carbone total ne permettent pas de se prononcer au niveau taxonomique. Il est possible d'estimer la teneur en carbone en utilisant des facteurs de conversion (voir Annexe C).

En outre, le biovolume est une base quantitative pour l'évaluation des dangers engendrés par les algues et les cyanobactéries pouvant contenir des métabolites nocifs ou toxiques ; il est utilisé en combinaison avec les nombres de cellules ou la concentration en chlorophylle-a dans les lignes directrices de l'OMS et dans de nombreuses réglementations nationales pour l'évaluation des risques.

Jusqu'à présent, différentes lignes directrices pour l'estimation du biovolume des algues microscopiques (microalgues) ont été utilisées dans les différents programmes de surveillance nationaux et internationaux (par exemple [1], [2], [3], [4]). Le principal objectif du présent document est la normalisation de la méthode de détermination du biovolume du phytoplancton afin de pouvoir comparer les données. Pour cette raison, l'estimation du biovolume d'échantillons de phytoplancton dans des chambres de sédimentation (selon Utermöhl) à l'aide d'un microscope inversé sera décrite de manière détaillée.

La présente Norme européenne est également applicable à l'analyse d'images provenant d'appareils photographiques montés sur des microscopes et sur des instruments de cytométrie de flux. Il sera recommandé d'utiliser un catalogue normalisé contenant les formes géométriques élémentaires et quelques formes géométriques composées. Il est bien entendu qu'une telle liste normalisée ne reflètera pas la variété de toutes les formes existant à l'état naturel et ne correspondra pas aux valeurs exactes du biovolume de chaque taxon. Elle sera toujours un compromis entre exactitude et efficacité. Toutefois, l'utilisation de formes géométriques convenues et l'application des formules appropriées amélioreront la comparabilité des données relatives au phytoplancton et constitueront une étape importante vers la mise en œuvre de mesures d'assurance de la qualité dans l'analyse du phytoplancton.

1 Domaine d'application

La présente Norme européenne spécifie une méthode permettant d'estimer le biovolume des taxons de phytoplancton marin et d'eau douce par microscopie inversée (technique d'Utermöhl selon l'EN 15204), en tenant compte du fait que certains protistes hétérotrophes (< 100 µm), qui ne sont pas pris en considération dans l'analyse de routine du zooplancton et des microalgues benthiques, peuvent se trouver dans des échantillons d'eaux pélagiques.

La présente Norme européenne décrit les méthodes nécessaires pour mesurer les dimensions des cellules et pour calculer les volumes de cellules ou d'unités de comptage afin d'estimer le biovolume d'échantillons de phytoplancton. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des attributions harmonisées de formes géométriques afin d'éviter les erreurs.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

EN 15204, *Qualité de l'eau — Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl)*

EN 15972, *Qualité de l'eau — Guide pour l'étude quantitative et qualitative du phytoplancton marin*

EN 16698, *Qualité de l'eau — Lignes directrices sur l'échantillonnage quantitatif et qualitatif du phytoplancton dans les eaux intérieures*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

biomasse

masse totale de la matière organique vivante dans un système ou un taxon

3.2

biovolume

volume total des organismes (vivants) dans un système ou un taxon

Note 1 à l'article : Le biovolume est habituellement exprimé en millimètres cubes par litre (mm³/l).

3.3

volume cellulaire

volume d'unités de comptage

volume total d'une cellule individuelle ou d'une unité de comptage

Note 1 à l'article : Le volume cellulaire ou le volume de l'unité de comptage comprend la paroi cellulaire (si elle existe) à l'exclusion de la lorica et/ou des enveloppes mucilagineuses et des structures de surface de la cellule telles qu'épines, soies et écailles.

Note 2 à l'article : Le volume cellulaire ou le volume de l'unité de comptage est habituellement exprimé en micromètres cubes (µm³).

4 Principe

En général, l'estimation du biovolume total ou du biovolume d'un taxon particulier dans un échantillon de phytoplancton de communautés naturellement présentes ou de cultures est basée sur un nombre représentatif

d'individus. Le biovolume total de chaque taxon dans l'échantillon est déterminé en multipliant le volume moyen ou médian des cellules ou des unités de comptage par l'abondance.

Il existe trois approches possibles :

- 1) **Estimation par mesure représentative** : Un nombre représentatif d'individus (dans la plupart des cas, des cellules individuelles) ou d'unités de comptage de tous les taxons enregistrés ou dominants est mesuré dans chaque échantillon ou dans un nombre spécifié d'échantillons au sein d'une série comparable. Ces données sont utilisées pour calculer le volume moyen ou médian de cellules ou d'unités de comptage de chaque taxon, à l'aide des formules correspondantes appliquées pour les formes géométriques.
- 2) **Estimation à l'aide de classes de taille basées sur des mesures représentatives** : Pour les taxons présentant une grande variabilité de taille des cellules (par exemple plusieurs diatomées, différents stades du cycle de vie), il est possible de déterminer tout d'abord des classes de taille raisonnables, puis d'affecter les individus à la fois au taxon et à la classe de taille pertinents. Les mesures effectuées de la manière décrites en (1) constituent la base pour la définition des classes de taille.
- 3) **Estimation à l'aide de volumes normalisés basés sur des mesures représentatives** : Un volume normalisé général raisonnable de cellules ou d'unités de comptage est défini une fois pour chaque taxon. Ces valeurs normalisées sont déterminées par des mesures représentatives et calculées par la formule des formes géométriques attribuées, telle que décrite dans (1).

Une forme géométrique doit être attribuée à chaque taxon dans toutes les approches pour calculer le volume de cellules ou d'unités de comptage. Par conséquent, pour harmoniser ces approches, des formes géométriques sont préalablement attribuées à tous les taxons (voir Annexe D). Ces formes ont été choisies de manière à refléter, aussi fidèlement que possible, les formes correspondantes des taxons et à permettre de mesurer les taxons efficacement et sans grand effort (c'est-à-dire avec un nombre de dimensions aussi réduit que possible ; en général, deux dimensions seulement sont nécessaires). Dix-sept formes géométriques différentes sont utilisées (pour le catalogue des formes géométriques, voir l'Annexe A). S'il est impossible de décrire la forme réelle d'un taxon à partir d'une forme géométrique simple de base, des formes composites (par exemple, cône avec demi-sphère) sont utilisées. Si la géométrie réelle des taxons ne coïncide pas exactement avec la forme attribuée, un facteur de correction géométrique est utilisé pour le calcul final du volume de cellules ou d'unités de comptage.

Des listes de taxons décrivant les formes géométriques préférentielles ont été publiées auparavant (voir par exemple [1], [3], [4]) ; elles sont fondées sur des niveaux taxonomiques particuliers ou concernent des régions particulières. Le présent document guide décrit des formes géométriques harmonisées pour les organismes phytoplanctoniques proliférant dans l'eau de mer, les eaux saumâtres et l'eau douce en Europe. L'Annexe D contient une liste alphabétique des genres avec les formes géométriques qui leur sont attribuées. Si certaines espèces, sous-espèces, formes ou variétés au sein d'un genre présentent des différences, elles sont énumérées en complément.

5 Matériels et conservateurs

Les matériels suivants sont requis pour l'analyse du biovolume des échantillons de phytoplancton.

5.1 Microscope inversé, équipé d'un condenseur présentant une ouverture numérique d'au moins 0,5 et d'objectifs plans avec une ouverture numérique de 0,9 ou plus, permettant un grossissement total compris entre 63x et 400x au minimum. Il convient que le microscope soit muni d'oculaires 10x ou 12,5x en fond clair (un contraste de phase supplémentaire est utile).

Bien que la microscopie inversée soit la méthode recommandée pour l'analyse du phytoplancton, il est également possible d'utiliser des microscopes classiques (non inversés) pour mesurer le phytoplancton dans certaines conditions.

5.2 Micromètre objet étalonné

5.3 Micromètre oculaire

5.4 Graticule de comptage

5.5 Chambres de sédimentation selon l'EN 15204.

5.6 Logiciel d'analyse d'images, si disponible.

5.7 Bouteilles d'échantillonnage selon l'EN 15204.

5.8 Conservateurs, solution acide d'iode de Lugol et/ou solution alcaline d'iode de Lugol selon l'EN 15204.

6 Mode opératoire**6.1 Échantillonnage et préparation des échantillons**

L'échantillonnage et la détermination de l'abondance et de la composition du phytoplancton est une condition préalable au calcul du biovolume d'un échantillon de phytoplancton. L'échantillonnage doit être effectué conformément à l'EN 16698 pour les échantillons d'eau douce et à l'EN 15972 pour les échantillons d'eau de mer. Pour le comptage et la détermination des espèces, voir l'EN 15204.

Les dimensions nécessaires à la détermination du biovolume des taxons phytoplanctoniques concernés sont analysées dans les chambres de sédimentation, qui sont préparées de la même manière que pour le comptage et la détermination des espèces (voir l'EN 15204), en utilisant un microscope inversé et un micromètre oculaire ou un logiciel d'analyse d'images.

À des fins scientifiques spécifiques, les mesures peuvent être également effectuées à l'aide d'un microscope classique (non inversé).

6.2 Étalonnage du micromètre oculaire, du graticule de comptage et du logiciel d'analyse d'images

Les dimensions requises pour la détermination du biovolume des cellules ou des unités de comptage doivent être mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire ou d'un logiciel d'analyse d'images. Pour l'application des classes de taille, il est également possible d'utiliser un graticule de comptage.

Avant la mesure, tous les systèmes doivent être étalonnés à l'aide d'un micromètre objet étalonné pour chaque microscope et tous les objectifs et oculaires utilisés.

L'échelle des micromètres objets étalonnés disponibles dans le commerce a une longueur de 1 mm (ou 2 mm) où le millimètre est divisé en 100 parties égales. La distance entre les graduations est de 10 µm. En alignant l'échelle du micromètre oculaire avec l'échelle du micromètre objet ou les mailles du graticule de comptage, il est possible de déterminer la valeur d'échelle (S) ou le facteur de conversion du micromètre oculaire pour chaque grossissement d'objectif, comme suit :

$$S = \frac{n_{obj} \times 10}{n_{eye}} \quad (1)$$

où

S est la valeur d'échelle (facteur de conversion) du micromètre oculaire, en micromètres (µm) ;

n_{obj} est le nombre de graduations du micromètre objet ;

n_{ocu} est le nombre de graduations du micromètre oculaire ou le nombre de mailles du graticule de comptage

Il convient que le facteur de conversion soit spécifié avec deux décimales au maximum. Les intervalles entre les graduations de l'échelle doivent être déterminés séparément à l'aide du micromètre objet étalonné pour chaque objectif utilisé.