

Protocole d'échantillonnage et analyse en laboratoire

ELEMENT DE QUALITE	PHYTOPLANCTON
SOUS ELEMENT DE QUALITE	-
SECTEUR GEOGRAPHIQUE	Méditerranée
CATHEGORIE DE MASSE D'EAU	Côtières
NOM(s) DE(s) L'ESPECE(s)	-
SITES CONCERNES	-
PARAMETRES DESCRIPTIFS	Chlorophylle a, nombre de blooms, espèces présentes
INDICES	Biomasse, abondance, composition taxinomique
METRIQUES	Percentile 90 des concentrations en chlorophylle a, % de blooms
PARAMETRES ASSOCIE(S)	Oxygène dissous, turbidité, température, salinité
DOMAINE D'APPLICATION	Directive Cadre sur l'eau 2000/60/CE
PERIODE(s) SUIVIE(s)	Janvier à décembre
FREQUENCE DU SUIVI SUR L'ANNEE	Mensuelle
FREQUENCE DU SUIVI SUR UN PLAN DE GESTION	Tous les ans
DOCUMENT(s) DE REFERENCE	NF EN 15972 Guide pour l'étude quantitative et qualitative du phytoplancton marin NF EN 15972 Aminot A, Kerouel R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Edition Ifremer Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie (méthode Utermöhl) NF EN 15204 Miossec Laurence. Guide méthodologique des méthodes DCE en hydrobiologie littorale. Rapport Aquaref 2013. 32p.



Certains détails peuvent différer des normes de référence en vigueur dans l'intérêt d'adapter les procédures aux besoins de la DCE.

PROTOCOLE : TERRAIN

PREPARATION

CONDITIONS

+/- 2 heures pleine mer

MATERIELS REQUIS

Bouteille à prélèvement

Flaconnage :

Observation des blooms : flacon plastique 1L (au minimum)

Mesure de la chlorophylle a : flacon plastique opaque de 2 L

Glacière

Glace

Lugol

DEROULEMENT PRELEVEMENT/MESURES et CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS

POSITIONNEMENT STATION

Consignes à terre et en mer

- les prélèvements se font en sub/surface : -1m
- il y a une tolérance de 200 m autour du point

Si les prélèvements ont lieu d'un bateau

- vérifier les coordonnées du point à l'arrivée sur le site
- éviter de se mettre sous l'influence du moteur

OBSERVATIONS/MESURES

-

PRELEVEMENTS

Prélèvement avec bouteille

- Armer la bouteille
- Vérifier que le robinet et la prise d'air sont fermés
- Immerger la bouteille
- Rincer la bouteille (laisser la bouteille quelques secondes entre la surface et -1m)
- Déclencher la fermeture de la bouteille et remonter la bouteille



Observation des blooms : 1L au minimum

Mesure de la chlorophylle a : 1L au minimum

Soutirage des échantillons

- Laisser couler quelque mL et rincer le flaconnage
- Remplir les flacons
- Ajouter le fixateur dès que possible (Iugol) pour le flacon qui servira au dénombrement phytoplancton
- Stocker les flacons dans la glacière à l'abri de la lumière pour le flacon qui servira au dosage de la chlorophylle (a)



- Lorsqu'une glacière est utilisée, éviter de l'exposer au soleil
- Assurer la traçabilité de l'échantillon (identification du flaconnage : date, heure, nom de la station, initiales des personnes...)

DOCUMENT(S) DE REFERENCE Guide pour l'étude quantitative et qualitative du phytoplancton marin NF EN 15972

PROTOCOLE : LABORATOIRE

PREPARATION

MATERIELS REQUIS	<p>Préparation lecture du phytoplancton Cuve à sédimentation Pipette Propipette Microscope inversé Iugol</p> <p>Préparation analyse de chlorophylle (a) Matériel de filtration sous vide Filtre (0,7µm) (GF/F Ⓞ 47 mm) Eprouvette graduée d'1L Pissette d'eau de mer filtrée Pissette d'eau déminéralisée Pince à bout plat Tubes plastiques Congélateur Papier aluminium</p> <p>Mesure des concentrations en chlorophylle (a) et phéopigments Baguette en verre Distributeur de solvant Acétone déshydratée de pureté garantie « pour analyse » Acide chlorhydrique concentré (0.3 mol/l) Eau déminéralisée Centrifugeuse réfrigérée Spectrophotomètre ou Fluorimètre Cuves opaques à bouchon de 5 cm de trajet optique ou tube pour fluorimètre Ordinateur portable Réfrigérateur Pipette 0-200µL et 500-5000µL</p>
PRETRAITEMENT	<p>Mise en cuve en vue de l'observation en microscopie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si ça n'a pas été fait au moment du prélèvement fixer l'échantillon au Iugol • Préparation des cuves à sédimentation : s'assurer que tout le matériel atteint l'équilibre avec la température ambiante de la pièce, travailler sur une surface horizontale plane, respecter les temps de sédimentation de la norme (EN 15204) <p>Filtration en vue de l'analyse de chlorophylle (a) La filtration est à faire le plus rapidement possible et moins de 10 h après le prélèvement</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eliminer les débris de macroalgues par pré filtration • Déposer un filtre sur le dispositif de filtration • Homogénéiser doucement l'échantillon • Mesurer 1l d'eau de mer avec l'éprouvette (il est préférable de filtrer au moins 2l afin d'être au-dessus de la LD) • Verser l'échantillon dans le dispositif de filtration • Actionner la pompe à vide (0,2 bar maximum) • Juste avant que le filtre ne vienne à sec, rincer les parois du dispositif avec un peu d'eau filtrée • Mettre le filtre dans un tube en plastique entouré de papier aluminium • Stocker au congélateur (-25°C) (2 mois maximum) <p>Si la totalité de l'éprouvette ne peut être filtrée : relever le volume réellement filtré et le noter</p>



- S'assurer de la conformité métrologique du matériel volumétrique et des températures des congélateurs
- Ne pas travailler en lumière intense

DEROULEMENT ANALYSES EN LABORATOIRE

Dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl)

Se référer à la norme NF EN 15204 pour la procédure

- La liste des espèces identifiables est accessible *via* le référentiel taxinomique de Quadrigé²

Mesure de la chlorophylle a

La méthode monochromatique est recommandée

Se référer au manuel Aminot A, Kerouel R., 2004.

Extraction

- Dans le tube contenant le filtre, ajouter 10 mL d'acétone 90% Déchiqueter le filtre à l'aide d'une baguette en verre
- Agiter
- Stocker le filtre dans un réfrigérateur
- Laisser l'extraction à l'acétone se faire pendant une nuit

Centrifugation

- Boucher les tubes et les positionner dans la centrifugeuse
- centrifuger pendant 1 minute (4000 tr/min) stopper et faire tomber les fibres collées à la paroi des tubes (ne pas remettre en suspension ce qui est déjà au fond)
- Puis centrifuger à 4000tr/min pendant 10min.
- Après centrifugation : stocker les tubes à l'abri de la lumière

Mesure spectrophotométrique

- Avant de passer les échantillons, faire un blanc de cuve
Passage des échantillons :
- Rincer 2 fois la cuve « Echantillon » avec la pissette acétone 90%
- Pipeter suffisamment de volume d'échantillon pour faire la mesure
- Boucher la cuve, essuyer bien les parois avec du papier Joseph
- Mesurer les absorbances aux longueurs d'ondes 665 et 750nm
- Sortir la cuve et ajouter 100µL de la solution chlorhydrique 0,3ml/L
- Agiter et replacer la cuve, laissé agir pendant 2 min
- Mesurer les absorbances aux longueurs d'ondes 665 et 750 nm
- Calculer les concentrations selon les méthodes recommandées dans Aminot et Kérouel

Mesure fluorimétrique

- Mettre en fonction le fluorimètre (environ 1h avant les mesures)
- Etalonner l'appareil selon les gammes susceptibles d'être utilisées
- rincer plusieurs fois la cuve « Echantillon » avec la pissette acétone 90% puis avec un peu d'échantillon à analyser
- Pipeter suffisamment de volume pour faire la mesure
- Mesurer la fluorescence
- Sortir la cuve et ajouter 100µL de la solution d'acide chlorhydrique 0,3ml/L
- Agiter et replacer la cuve, laissé agir pendant 2 min
- Mesurer la fluorescence
- Calculer les concentrations selon les méthodes recommandées dans Aminot et Kérouel



- Mesure de la chlorophylle a : manipulation des solvants sous hotte, travailler dans la pénombre
- S'assurer que tout le matériel atteint l'équilibre avec la température ambiante de la pièce

DOCUMENT(S) DE REFERENCE

Aminot A, Kerouel R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Edition Ifremer
Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie (méthode Utermöhl) NF EN 15204