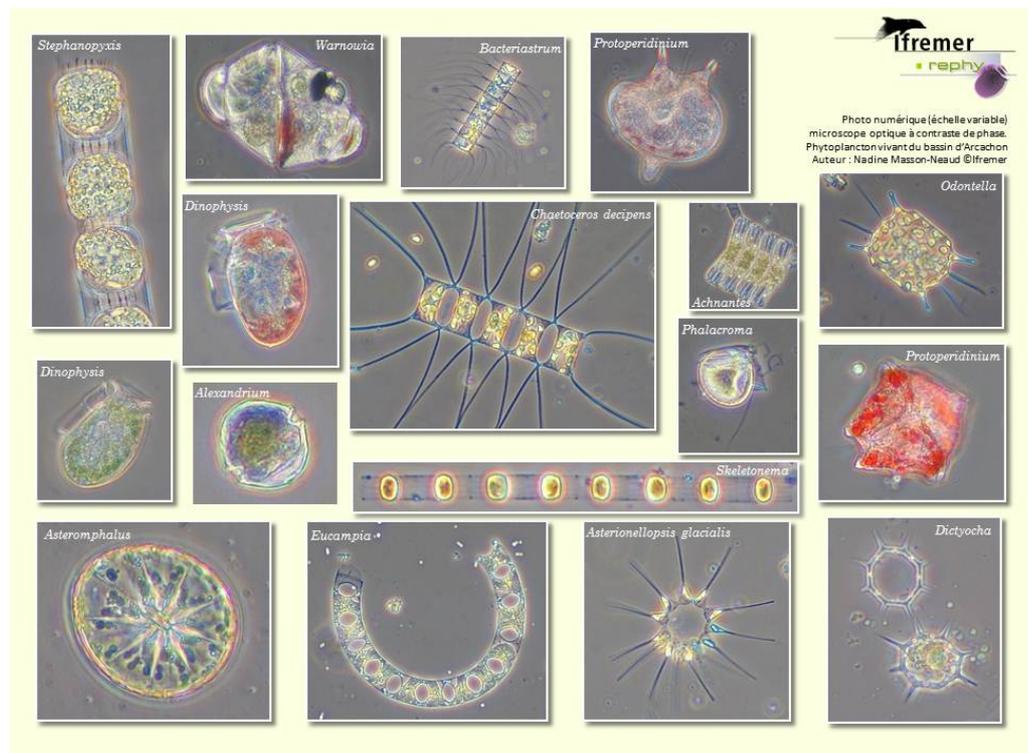


# Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique photonique - Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY

Document de méthode

Date d'application : 1<sup>er</sup> janvier 2016



ce document, propriété de l'Ifremer, ne peut être reproduit ou communiqué sans son autorisation



### Historique des révisions :

- Création- Document d'origine Grosse H., **décembre 2006**. Manuel d'observation et de dénombrement du phytoplancton marin. Document de méthode REPHY. Document Ifremer / EMP.
- Version révisée d'octobre 2015 Cette nouvelle version remanie et s'inspire du document de référence d'origine dont certains paragraphes sont repris intégralement. Elle précise les méthodes appliquées dans le cadre du REPHY. Des précisions au sujet du matériel, de la métrologie et des consignes de sécurité sont ajoutées, ainsi que des informations concernant les limites pour les identifications. Le texte en bleu matérialise les ajouts ou modifications par rapport au document d'origine.

### Liste de diffusion interne contrôlée (Le document est transmis aux intéressés avec un accusé de réception)

Tous responsables des Laboratoires Environnement et Ressources (LITTORAL-LERs)  
Tous responsables Qualité des LERs  
Tous correspondants REPHY des LERs  
Responsable de l'Unité Littoral

### Relecteurs :

Le présent document a été vérifié et complété par :

Élisabeth Nézan (LER / BO), Nicolas Chomérat (LER/BO) et Luis Lampert (DYNECO-PELAGOS).

**Date de mise en application : 1<sup>er</sup> janvier 2016**

<p><b>rédigé par :</b> Nadine Neaud-Masson</p> <p><b>Fonction</b> Assistante coordination REPHY</p> <p><b>Signature</b></p>  <p><b>Date 26/10/2015</b></p>	<p><b>approuvé par :</b> René Robert</p> <p><b>Fonction</b> Responsable Unité Littoral</p> <p><b>Signature</b></p>  <p><b>Date 30/10/2015</b></p>	<p><b>approuvé par :</b> Jérôme Paillet</p> <p><b>Fonction</b> Directeur ODE</p> <p><b>Signature</b></p>  <p><b>Date 30/10/2015</b></p>
---	---	--

Les documents de prescriptions et de méthodes sont téléchargeables sur le site : <http://envlit.ifremer.fr/>

## SOMMAIRE

1	Introduction - Contexte .....	4
2	Domaine d'application et stratégie .....	5
3	Documents de référence .....	6
3.1	Documents à caractère réglementaire .....	6
3.2	Documents normatifs.....	6
3.3	Documents qualité .....	7
3.4	Documents et outils d'appui aux déterminations.....	7
3.5	Autres documents.....	8
4	Termes et définitions.....	9
5	Équipement et environnement .....	10
5.1	Consignes de sécurité.....	10
5.2	Équipements .....	11
5.3	Matériels et produits.....	12
6	Traitement des échantillons .....	17
6.1	Réception .....	17
6.2	Conservation : fixation et stockage des échantillons.....	17
6.3	Délais d'analyse.....	18
6.4	Préparation pour analyse.....	18
7	Identification et dénombrement.....	20
7.1	Flores totales (FLORTOT).....	21
7.2	Flores partielles indicatrices (FLORIND) .....	21
7.3	Flores partielles (FLORPAR).....	21
7.4	Mode opératoire des comptages.....	22
8	Validation des résultats .....	29
8.1	Validation quantitative.....	29
8.2	Validation qualitative .....	30
9	Bancarisation des données dans quadrige .....	30
10	Gestion des compétences et habilitation.....	32
10.1	Habilitation initiale .....	33
10.2	Maintien de l'habilitation.....	34
10.3	Re-habilitation.....	34



ANNEXE I.	Réglages du microscope inversé (exemple : Olympus IMT2) .....	35
ANNEXE II.	Étalonnages .....	38
ANNEXE III.	Identification et comptage des cellules : cas particuliers.....	41
ANNEXE IV.	Documents et outils d'aide à l'identification.....	47
ANNEXE V.	Modèle exemple de fiche de résultat.....	49
ANNEXE VI.	Précision des comptages .....	53

## 1 INTRODUCTION - CONTEXTE

Rappel des missions et objectifs du Réseau [d'observation](#) et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines (REPHY) :

L'Ifremer est chargé d'apporter à l'État et aux autres personnes morales de droit public son concours pour l'exercice de leurs responsabilités notamment pour le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin (Décret du 5 juin 1984 modifié).

La mise en œuvre d'un Réseau [d'observation](#) et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines (REPHY) depuis sa création en 1984, répond à cette mission et le concours apporté à l'Administration Centrale se concrétise particulièrement en un soutien :

- à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) du [Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt \(MAAF\)](#), pour l'application de la réglementation relative au suivi de la salubrité des zones de production de coquillages,
- au [Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie \(MEDDE\)](#), et à l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), pour l'application de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) concernant la surveillance de l'élément phytoplancton et des paramètres hydrologiques dans le milieu littoral.

**Les objectifs du REPHY sont :**

- **la connaissance de la biomasse, de l'abondance et de la composition du phytoplancton marin des eaux côtières et lagunaires, qui recouvre notamment celle de la distribution spatio-temporelle des différentes espèces phytoplanctoniques, le recensement des efflorescences exceptionnelles telles que les eaux colorées ou les développements d'espèces toxiques ou nuisibles susceptibles d'affecter l'écosystème, ainsi que du contexte hydrologique afférent ;**
- **la détection et le suivi des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines susceptibles de s'accumuler dans les produits marins de consommation ou de contribuer à d'autres formes d'exposition dangereuse pour la santé humaine, et la recherche de ces toxines dans les mollusques bivalves présents dans les zones de production ou dans les gisements naturels.**

## 2 DOMAINE D'APPLICATION ET STRATEGIE

Ce manuel vise à décrire les protocoles usuellement appliqués par les équipes de l'Ifremer dans le cadre du Réseau d'observation et de surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines (REPHY), pour l'estimation de l'abondance et de la composition taxinomique du phytoplancton marin, en nombre de cellule par litre, dans un échantillon d'eau fixée au lugol, à l'aide d'un microscope inversé et de chambres de sédimentation.

Les résultats de ces analyses attendus dans le cadre des objectifs du REPHY cités en introduction sont bancarisés dans la base de données Quadrige.

Les protocoles appliqués s'inspirent des lignes directrices de la norme NF EN 15204 fondée sur la technique de sédimentation classique telle que définie par Utermöhl en 1958.

La méthodologie décrite dans ce document n'interdit pas l'application d'autres recommandations inscrites dans la norme NF EN 15204.

Ce manuel ne concerne pas : la collecte d'échantillon sur le terrain, l'analyse du picoplancton, l'analyse quantitative d'amas flottant de cyanobactéries, ni l'estimation de biovolume.

Les recommandations inscrites dans ce manuel visent à optimiser la durée d'une analyse tout en conservant un bon niveau de qualité du résultat.

L'incertitude qualitative relative à l'erreur d'identification est réduite au maximum en n'identifiant pas un taxon à un niveau de précision supérieur à celui maîtrisé par l'analyste, ou en sollicitant l'avis d'un expert cité dans ce document. Toutefois, distinguer certaines espèces pose d'énormes difficultés. Afin de conserver un maximum d'information sur la morphologie caractéristique de l'objet algal observé, dans certains cas, il est conseillé de saisir le résultat sur un nom d'espèce qui représente le groupe ou complexe de cette espèce (voir exemples en ANNEXE III).

L'incertitude quantitative concerne le résultat de dénombrement de chaque taxon et est évaluée, selon l'0), en fonction du nombre de cellules observées. Les éléments nécessaires à l'évaluation de l'incertitude sont tracés et conservés par le laboratoire analyste.

La validation des résultats repose sur le système qualité du laboratoire incluant la traçabilité, la métrologie, la participation à des essais d'inter-comparaisons intra et inter laboratoires.

### 3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

Le Cahier de Procédure REPHY liste les documents de référence qui composent les instructions générales.

Les points suivants listent les documents de référence qui concernent plus spécifiquement l'objet du présent manuel.

#### 3.1 DOCUMENTS A CARACTERE RÈGLEMENTAIRE

Pour le phytoplancton en tant qu'indicateur biologique

**Directive n° 2000/60/CE du 23 octobre 2000** du Parlement européen et du Conseil, établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.

*Cette directive établit un cadre pour la protection des eaux intérieures de surface, des eaux de transition, des eaux côtières et des eaux souterraines. Elle définit le « bon état écologique » à atteindre pour une « masse d'eau » déterminée géographiquement. Pour les eaux côtières, ce bon état écologique englobe (annexe 5 de la Directive, éléments de qualité biologique) la composition et l'abondance des taxons phytoplanctoniques.*

**Arrêté du 27 octobre 2011** portant modalités d'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques au titre du code de l'environnement.

*L'arrêté indique : le laboratoire national de référence pour la surveillance de l'eau et des milieux aquatiques (AQUAREF) définit les méthodes associées aux éléments de qualité biologiques. Ces méthodes sont publiées conformément aux conditions définies dans l'article 12 du présent arrêté.*

*Ceci concerne, entre autres, le paramètre phytoplancton avec de plus un délai maximal de 18 mois pour s'assurer que les prélèvements sont réalisés soit par un organisme accrédité, soit par une personne habilitée des services de police de l'environnement.*

**Avis du 04 février 2012** relatif aux méthodes des couples « élément de qualité biologique – méthode » sur lesquels porte l'agrément des laboratoires.

*Ces méthodes ainsi que leurs dates d'entrée en vigueur sont mises en ligne sur le site Internet de gestion des agréments du ministère chargé de l'environnement ([www.labeau.ecologie.gouv.fr](http://www.labeau.ecologie.gouv.fr)).*

#### 3.2 DOCUMENTS NORMATIFS

Le présent document est rédigé en s'appuyant principalement sur la norme :

NF EN 15204, **Qualité de l'eau – Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode d'Utermöhl)**. Parue en décembre 2006.

Pour certains points, peu ou pas abordés dans la précédente norme et en lien avec le traitement de l'échantillon, ce manuel s'appuie aussi sur :

NF EN 15972, **Guide pour l'étude quantitative et qualitative du phytoplancton marin**. Parue en décembre 2011.

### 3.3 DOCUMENTS QUALITÉ

#### 3.3.1 DOCUMENTS QUALITE GENERAUX

**Norme NF EN ISO/CEI 17025** : prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Version en vigueur.

**LAB Réf 02**. Version en vigueur. Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 ; document du COFRAC.

**LAB-REF-18** du COFRAC (exigences spécifiques - analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques au titre du code de l'environnement) est **applicable depuis le 1er janvier 2012**.

*Il définit les exigences à satisfaire par les laboratoires œuvrant dans le cadre de l'arrêté du 27 octobre 2011 et ce, conformément aux obligations imposées par le ministère chargé de l'environnement et aux textes réglementaires en vigueur, en vue d'obtenir l'agrément pour ces activités.*

#### 3.3.2 DOCUMENTS QUALITE IFREMER

Chaque laboratoire dispose des documents qualité nécessaires pour :

- répondre aux exigences des documents qualité généraux de référence,
- assurer l'application des instructions nationales du cahier des procédures REPHY,
- assurer la traçabilité et la qualité des résultats, du prélèvement à la saisie des données dans la base Quadrige,
- assurer le contrôle et la validation des données dans la base Quadrige<sup>2</sup>.

### 3.4 DOCUMENTS ET OUTILS D'APPUI AUX DÉTERMINATIONS

La liste de référence des taxons phytoplanctoniques potentiellement identifiables se trouve dans le référentiel taxinomique de la base de données Quadrige<sup>2</sup>, qui s'appuie sur le référentiel mondial **WORMS**<sup>1</sup>.

Chaque LER doit connaître la liste des taxons historiquement identifiés dans leurs secteurs géographiques.

Une liste non exhaustive des documents et outils est fournie en ANNEXE IV. Les laboratoires disposent de tout ou partie de ces références.

---

<sup>1</sup> WORMS = World Register of Marine Species - <http://www.marinespecies.org/index.php>



### 3.5 AUTRES DOCUMENTS

D. Soudant, L. Miossec, 2013. Note bibliographique : Incertitude des mesures phytoplanctoniques.  
DYNECO/VIGIES/13-10/DS

IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae - a product of the [IOC Harmful Algal Bloom Programme](#) and the [World Register of Marine Species](#).  
<http://www.marinespecies.org/hab/>

## 4 TERMES ET DEFINITIONS

**Chambre de sédimentation** (aussi appelée **cuve** de sédimentation) : enceinte en général tubulaire, dont la face inférieure est une lamelle d'observation au microscope (épaisseur de quelques 10<sup>ème</sup> de mm), et la face supérieure une lame de verre.

**Champ de comptage du microscope** : zone délimitée (par exemple un carré ou une grille) dans le champ de vision du microscope, utilisée pour le dénombrement. Ce champ est positionné au niveau de l'oculaire. Le champ de comptage peut aussi correspondre au champ oculaire dans sa totalité.

**Cœnobe** : ensemble pluricellulaire, numériquement et morphologiquement défini (le nombre de cellule d'un cœnobe est généralement égal à une puissance de deux). Le cœnobe correspond à une unité dans laquelle on reconnaît une harmonie et une solidarité fonctionnelles entre les individus. Exemple : *Scenedesmus*, *Pediastrum* (Chlorophycées).

**Conservation** : processus qui protège les substances organiques contre la décomposition.

**Echantillon d'eau** : c'est une partie représentative du prélèvement d'eau.

**Erreur** : différence entre un résultat individuel et la valeur vraie.

**Fixation** : protection contre la désintégration de la structure morphologique des organismes.

**Incertitude** : valeur associée au résultat d'un comptage qui caractérise la dispersion des valeurs qui peut être raisonnablement attribuée à l'objet mesuré.

**Lecture, comptage, dénombrement** : réalisation de l'identification des espèces phytoplanctoniques présentes dans la cuve et leur dénombrement dans un volume élémentaire (totalité ou partie de la cuve).

**Microplancton** : organismes planctoniques de taille supérieure à 20 µm.

**Nanoplancton** : organismes planctoniques de taille comprise entre 2 µm et 20 µm.

**Objet algal** : unité/groupe d'une ou plusieurs cellules d'algues, rencontré(es) lors de l'analyse du phytoplancton, qui est indépendant(e) (peut sédimenter de manière indépendante) des autres particules de l'échantillon.

**Phytoplancton** : communauté d'organismes libres en suspension principalement photosynthétiques dans les systèmes aquatiques, comprenant les cyanobactéries et les algues.

**Picoplancton** : organismes planctoniques de taille comprise entre 0,2 µm et 2 µm.

**Prélèvement d'eau** : c'est une partie représentative d'une masse d'eau, sur un point de prélèvement donné, à une date et une heure donnée, avec un engin de prélèvement donné à une profondeur donnée (ou sur une partie de la colonne d'eau, en cas de prélèvement intégré).

**Validation** : confirmation par examen et preuves tangibles que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont satisfaites.

*Nota* : la validation au sens de la base Quadriga est l'action effectuée dans la base qui certifie que l'opération de contrôle a été réalisée, en vérifiant la cohérence entre les données saisies dans la base et le cahier de laboratoire.

## 5 ÉQUIPEMENT ET ENVIRONNEMENT

### 5.1 CONSIGNES DE SECURITE

Les utilisateurs doivent connaître les consignes générales de sécurité et mettre en place les pratiques appropriées en matière d'hygiène et sécurité.

Plus spécifiquement, en ce qui concerne l'objet de ce manuel, l'utilisateur doit savoir que le travail sous microscope est considéré comme un travail à forte charge visuelle dans le domaine de la sécurité du travail.

L'analyse microscopique du phytoplancton pendant de longues durées peut engendrer de la fatigue physique et influencer sur la vue.

Afin de prévenir les risques :

Il convient de veiller à bien doser l'intensité du faisceau lumineux afin que l'éclairage dans les oculaires soit suffisant mais pas trop intense.

Il convient aussi de prêter attention aux caractéristiques ergonomiques du poste de travail.

Il convient de pratiquer des poses régulières, et d'éviter, autant que possible, des séquences de travail supérieures à 4 heures par jour, particulièrement lorsque cette activité est effectuée quotidiennement.

*Note : en cas d'interruption d'un comptage en cours, il faut signaler de manière visible qu'un comptage est en cours, et noter si possible la position de la platine grâce aux échelles verticale et horizontale qui la bordent ou à partir de repères disposés sur la platine à cet usage.*

L'emploi des produits chimiques mentionnés dans ce manuel peut être dangereux pour l'utilisateur et/ou pour l'environnement. Les utilisateurs doivent suivre les recommandations des fabricants, et des fiches toxicologiques de l'iode et du formol qui doivent être disponibles aux endroits où ces produits sont stockés ou utilisés.

La solution de lugol utilisée et le formol sont des produits dangereux pour l'environnement, les déchets doivent donc être conservés dans des récipients étanches clairement étiquetés et être éliminés dans les conditions autorisées par la réglementation.

Pour plus de renseignement concernant l'hygiène et sécurité en laboratoire, l'Ifremer dispose d'un site intranet consultable à l'adresse suivante :

<http://w3z.ifremer.fr/securite/>

## 5.2 ÉQUIPEMENTS

### 5.2.1 MICROSCOPE

Le laboratoire doit être équipé au moins d'un microscope inversé à contraste de phase muni de :

- source lumineuse halogène de 50 à 100 W. 100 W de préférence ou équivalent en LED.
- condenseur avec une ouverture numérique (ON)  $\geq 0.3$  /contraste de phase et une longue distance de travail (ULWD : Ultra Long Working Distance)
- objectifs plans fluorite phase de x 10 (ON = 0.3), x 20 (ON  $\geq 0.45$ )
- objectif plan fluorite x 40 (ON  $\geq 0.60$ ) avec une bague de correction d'épaisseur
- accessoirement un objectif achromatique x 4 (ON 0.10)
- oculaires grand champ (Field number F.N.  $\geq 22$  mm) de grossissement x 10
- micromètre oculaire (réticule) étalonné pour chaque objectif
- platine mobile actionnée par des commandes coaxiales et équipée de réglettes (X,Y)

Si l'appareil est équipé d'une bague de grossissement supplémentaire (x 1.5 ou x 1.6) l'objectif x 20 devient inutile, car le balayage de la chambre de sédimentation peut se faire avec l'objectif x 10 couplé à la bague x 1.5.

Ces spécifications diffèrent, volontairement, légèrement, de celles préconisées dans la norme NF EN 15204 car elles sont mieux adaptées pour les observations en cuves (ON plus faibles avec longues distances de travail). De plus, il vaut mieux privilégier l'optique que prendre un statif très performant (donc très coûteux). Un statif milieu de gamme avec un seul port photo/vidéo suffit.

Afin de permettre la confirmation de la détermination spécifique par consultation d'un expert, ainsi que de constituer une base documentaire photographique, il est recommandé qu'au moins un microscope du laboratoire soit équipé d'un appareil photo numérique ou d'une caméra.

Chaque microscope doit disposer d'un dossier comprenant au moins :

- Les documents du constructeur (à lire attentivement)
- Un document d'enregistrement des opérations de maintenance
- La fiche d'enregistrement des contrôles métrologiques de l'appareil (cf. ANNEXE II)

Les consignes de maintenance et d'entretien préconisées par le constructeur doivent être respectées et toute intervention de maintenance doit être tracée. Une visite annuelle est requise via un contrat de maintenance souscrite auprès d'un professionnel.

Le microscope doit être positionné sur une surface horizontale et stable et ne doit pas être exposé à la lumière directe du soleil.

Les analyses étant réalisées sur de l'eau de mer et le sel étant extrêmement corrosif, le nettoyage doit être systématique et méticuleux, sous peine d'endommagement irréversible du matériel.

Afin de préserver toutes les performances du microscope et de limiter les particules parasites, Il convient de protéger le microscope des poussières en le couvrant d'une housse entre deux usages.

Avant chaque usage il convient d'effectuer les réglages préconisés dans les documents du constructeur (voir pour exemple, la procédure de réglage du Microscope inversé Olympus IMT2 en ANNEXE I). Pour les autres modèles, voir les documents du constructeur.

Des opérations de contrôle métrologique sur le micromètre oculaire et sur les diamètres des champs pour chaque grossissement doivent être réalisées (cf. ANNEXE II).

### 5.2.2 RÉFRIGÉRATEUR

Le laboratoire estime les volumes nets nécessaires des réfrigérateurs en fonction du volume d'échantillons traités par celui-ci.

Pour le stockage des échantillons d'eau non fixés le réfrigérateur doit permettre une température de 4 à 10 °C.

Pour le stockage de longue durée des échantillons fixés, la température recommandée est comprise entre 1 et 5 °C.

Les réfrigérateurs font l'objet d'un contrôle régulier de la température.

Le système de froid statique est suffisant, et particulièrement recommandé pour les échantillons non fixés, dans ce cas la sonde de contrôle de la température devra être disposée dans la partie haute de l'enceinte du réfrigérateur (la partie la plus chaude).

## 5.3 MATÉRIELS ET PRODUITS

### 5.3.1 LAME ÉTALON



Figure 1 : Image d'une lame micromètre étalon

Cette lame, généralement constituée par la gravure d'un millimètre divisé en 100 parties de 10  $\mu\text{m}$  sous une lamelle, permet l'étalonnage du micromètre oculaire (observation lamelle tournée vers l'objectif). Ce micromètre étalon doit être certifié par le fabricant.

### 5.3.2 FLACONNAGE



Figure 2 : photos de flaconnages de terrain

#### Flaconnage de prélèvement :

- Flacons n'ayant jamais contenu de fixateur, ces flacons sont utilisés pour les échantillons d'eau brute non fixée.
- Flacons ayant déjà servi pour un échantillon d'eau fixé au lugol (parois colorées en brun).
- Flacons bruns.

Ils peuvent être en polyéthylène (PE), polypropylène (PP) ou en chlorure de polyvinyle (PVC)

De préférence à col large pour faciliter le remplissage sur le terrain.  
 En générale d'un litre de volume et au minimum de 250 mL.



Figure 3 : photos de flaconnages de stockage

#### Flaconnage de stockage longue durée :

Pour une conservation de longue durée les échantillons sont transférés dans des flacons en verre transparent de préférence afin de pouvoir contrôler la décoloration due à l'oxydation du lugol.

### 5.3.3 CHAMBRE DE SÉDIMENTATION

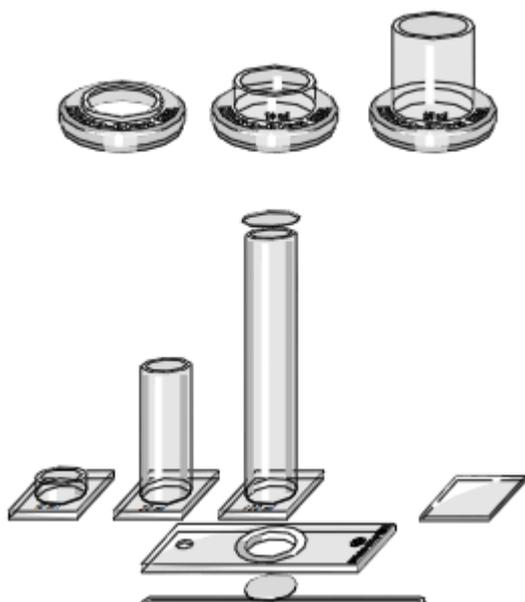


Figure 4 : images de chambres de sédimentation

Les chambres de sédimentation couramment utilisées par les observateurs du REPHY sont cylindriques, d'un volume de 10 mL.

Ce volume peut être porté à 20 ou 25 mL, pour des eaux peu turbides et peu chargées en phytoplancton. Inversement, pour les eaux très turbides ou très chargées en phytoplancton des cuves de 1 ou 2,5 mL peuvent être utilisées.

Les chambres d'un volume supérieur (50 ou 100 mL) présentent l'inconvénient que la sédimentation peut être gênée par la formation de courants de convections au sein de la colonne d'eau. Elles sont donc déconseillées pour réaliser des flores totales, mais peuvent être utilisées en complément d'une cuve de 10 mL, pour la détection des espèces rares.

L'épaisseur de la lamelle basale ne doit de préférence pas être supérieure à 0,17 mm.

Le volume de chaque cuve est contrôlé selon les méthodes métrologiques appliquées pour les volumes (cf. point 8.1.)

Les chambres de sédimentation (et leur couvercle) sont nettoyés entre deux utilisations. Le nettoyage comprend le trempage et lavage avec du détergent à l'aide d'un pinceau souple, le rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée pour éviter les traces résiduelles.

L'usage du méthanol, de l'éthanol, de l'alcool « dénaturé » industriel, l'isopropanol ou l'acétone est à proscrire, en raison de leur toxicité d'une part et de la sensibilité des parois des cuves à ce type de solvant d'autre part.

Les fonds de cuves sont très fragiles et doivent être remplacés régulièrement. Leur état doit être contrôlé lors du nettoyage.

Le nettoyage des cuves ne doit pas endommager les surfaces internes des parois qui doivent être maintenues lisses afin d'éviter l'accrochage des cellules lors de la sédimentation.

### 5.3.4 PIPETTES

Le remplissage des chambres de sédimentation peut se faire soit directement à partir du flacon si son col le permet, soit avec une pipette de transfert de volume adéquat. Le pipetage s'effectue à l'aide d'une poire d'aspiration. Il convient de choisir des pipettes dont l'extrémité est assez large pour ne pas rompre d'éventuelles colonies de phytoplancton, ou exclure des cellules de grande taille.

Le volume des chambres de sédimentation étant contrôlé métrologiquement, il n'est pas utile de contrôler celui des pipettes.

### 5.3.5 COMPTEUR DE CELLULE

Différents types de compteurs manuels de cellules, empruntés aux compteurs de type analyse médicale (analyse sanguine) sont proposés dans le commerce. Ils peuvent être une aide utile pour le dénombrement des taxons les plus abondants d'un échantillon. Ils peuvent être manuels ou à affichage digital, à simple ou multiples touches. Les compteurs manuels évitent tout effacement accidentel du décompte.



Figure 5 : photos de différents types de compteurs de cellule

Il convient d'effectuer un **contrôle de bon fonctionnement du compteur** et de le **remettre zéro** avant toute utilisation.

## 5.3.6 PRODUITS

### 5.3.6.1 PRODUITS DE FIXATION

Dans le cadre du REPHY, le fixateur utilisé habituellement est le lugol acide.

**Préparation du lugol acide** : effectuer la dissolution sous hotte et porter des gants en nitrile et des lunettes de protection. Dissoudre 100 g de KI (iodure de potassium) dans 1 L d'eau distillée ou déminéralisée, puis ajouter 50 g d'iode (cristallin), agiter jusqu'à complète dissolution et ajouter 100 g d'acide acétique glacial (préparation à réaliser dans l'ordre en s'assurant que l'ingrédient précédent a été complètement dissous avant d'ajouter le suivant). Lorsque la solution est proche de la saturation, il convient d'éliminer tout précipité éventuel en faisant décanter la solution avant l'utilisation. Cette solution doit être conditionnée dans un flacon brun sombre étiqueté (Lugol acide – date de fabrication) et peut être stockée pendant au moins un an à température ambiante à l'abri de la lumière.

*Dans la perspective de l'utilisation de l'épifluorescence, l'utilisation du lugol neutre doit être envisagée, car l'acide empêche la coloration des plaques celluloseuses par le calcofluor.*

L'usage du formol est réservé aux cas particuliers tels que la conservation sur de longues durées ou la fixation des échantillons très concentrés (cas des traits de filet à plancton). Le formol utilisé est de préférence neutre à faiblement basique soit pour 1 L de formaldéhyde à 20 % ajouter 100 g d'hexaméthylènetétramine (hexamine,  $C_6H_{12}N_4$ ) et filtrer après une semaine pour éliminer tout précipité.

En raison des risques induits sur la santé des utilisateurs, le formol doit être manipulé **avec des gants (caoutchouc nitrile ou néoprène), des lunettes de sécurité** et sous hotte aspirante.

### 5.3.6.2 PRODUITS DE NETTOYAGE

Pour le nettoyage des cuves à sédimenter et des flacons ayant contenu un échantillon lugolé et tout autre matériel ayant contenu de l'eau lugolée, afin de s'assurer de l'élimination de toutes les particules, l'usage d'un détergent alcalin à haute rinçabilité est préconisé. Les flacons sont frottés à l'aide d'un écouvillon et les cuves à l'aide d'un pinceau souple.

Pour le nettoyage des parties optiques du microscope (oculaires et objectifs), aucun détergeant ne doit être utilisé. L'essuyage est réalisé uniquement à l'aide de papier optique non abrasif.

## 6 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

### 6.1 RÉCEPTION

Le laboratoire doit se munir d'une procédure de réception des échantillons décrivant les étapes entre l'arrivée d'un échantillon et sa préparation pour l'analyse. Celle-ci doit préciser au minimum : où les échantillons sont pris en charge et par qui, que faire en l'absence de responsable, quels sont les critères d'acceptabilités des échantillons.

Les critères d'acceptabilités minimum et principaux sont :

- Flacon étanche rempli par l'échantillon à hauteur d'environ 80 %
- Echantillon correctement identifié permettant de connaître au minimum le lieu, la date et l'heure du prélèvement et de faire le lien avec tous les renseignements liés (niveau, engin de prélèvement, agent préleveur, paramètres physico-chimiques mesurés *in situ*, etc).

Chaque échantillon réceptionné, accepté ou non selon les critères établis, doit être enregistré dans un document. Les raisons de la non acceptation de l'échantillon y sont tracées. Il est d'usage d'attribuer un numéro d'enregistrement incrémenté pour chaque échantillon et d'inscrire ce numéro sur le flacon.

### 6.2 CONSERVATION : FIXATION ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS

Dans le cadre du REPHY, les échantillons peuvent être de deux types, soit ce sont des échantillons dit "frais" ou "vivants" ne contenant pas de fixateur, soit l'échantillon est fixé (généralement au lugol acide ou neutre au moment du prélèvement). Le stockage est différent selon les cas.

#### 6.2.1 FIXATION DE L'ECHANTILLON

Afin d'éviter la perte de cellules phytoplanctoniques, la fixation doit avoir été réalisée immédiatement lors du transfert du prélèvement dans le flacon d'échantillonnage (cf. p 13 NF EN 15972).

Pour un flacon d'1 litre, la quantité de lugol à ajouter varie entre 1 et 10 mL en fonction de la densité algale.

Une post-fixation avec du formaldéhyde est recommandée si l'échantillon doit être stocké pendant plus de 12 mois ou s'il contient une grande quantité de matière organique. Toutefois, cela détruit irrémédiablement l'ADN et par conséquent rend toute expertise avec des techniques moléculaires, impossible ultérieurement.

Les autres fixateurs cités dans les normes de référence peuvent être utilisés et sont choisis par les laboratoires en fonction des recommandations des normes.

## 6.2.2 STOCKAGE DE L'ÉCHANTILLON

Les échantillons non fixés (vivant) servent à une analyse préliminaire ou à la confirmation de l'identification de certains taxons. Ces échantillons doivent être conservés à l'abri de la lumière à une température comprise entre 4 et 10 °C (l'abaissement de la température doit être réalisé progressivement afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques). L'analyse doit être effectuée dans les 36 h suivant le prélèvement. Il est recommandé de laisser le flacon ouvert pour éviter l'appauvrissement en oxygène.

Le flaconnage utilisé pour le prélèvement sur le terrain est usuellement en matière plastique pour éviter la casse. Pour protéger l'intégrité de l'échantillon fixé, lors d'une conservation prolongée (> 3 mois), au laboratoire, il est préférable de transvaser l'échantillon dans un flacon en verre.

Les échantillons fixés, prévus d'être analysés dans la semaine qui suit le prélèvement, doivent être conservés à l'abri de la lumière à température ambiante.

Après l'analyse, et à l'appréciation du laboratoire, les échantillons peuvent être conservés pour une plus longue durée. Dans ce cas la température de stockage est comprise entre 1 et 5 °C. Dans ces conditions, la qualité de l'échantillon est préservée pendant environ 12 mois à condition de contrôler régulièrement l'oxydation du lugol et d'ajuster la coloration en ajoutant de la solution de lugol le cas échéant. Même dans ces conditions, le stockage longue durée ne garantit pas la conservation de l'intégralité de tous les organismes présents à l'origine.

## 6.3 DELAIS D'ANALYSE

Les analyses réalisées dans le cadre de la détection et du suivi des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines (volet sanitaire) sont réalisées le plus rapidement possible et au moins durant la semaine suivant le prélèvement.

Un délai plus large est accordé pour les analyses réalisées dans le cadre environnemental, sans toutefois excéder les temps optimum de conservation et sans atteindre une accumulation d'un trop grand nombre d'échantillons. Dans ces conditions, le délai préconisé est d'un mois.

## 6.4 PRÉPARATION POUR ANALYSE

Afin de permettre une distribution aléatoire du plancton après sédimentation dans le fond de la cuve, et d'éviter la formation de bulles par dégagement gazeux lors du réchauffement de l'échantillon, tout le matériel doit avoir atteint l'équilibre avec la température ambiante de la pièce dans laquelle les analyses vont être effectuées. Pour un échantillon d'1 litre la période d'atteinte de l'équilibre thermique peut aller jusqu'à 12 heures, d'où l'utilité de stocker à température ambiante l'échantillon en attente d'analyse.

L'homogénéisation est une étape critique de l'analyse. Celle-ci est effectuée manuellement par 30 retournements doux du flacon. Cette homogénéisation n'est efficace que si le flacon n'a pas été rempli complètement (remplir à, hauteur d'environ 80%).

**Ces deux étapes sont extrêmement importantes pour la qualité du résultat.**

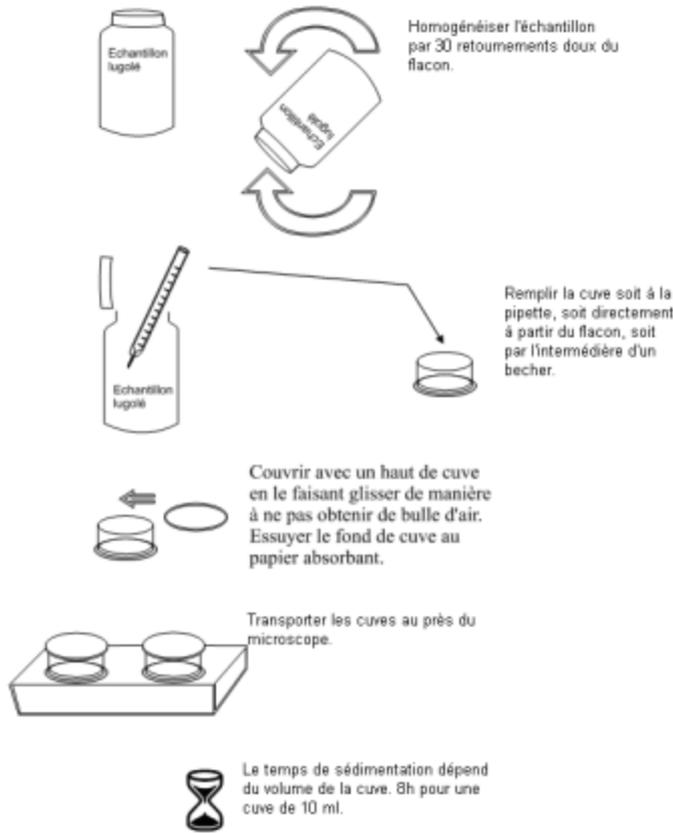


Figure 7 : illustration de la préparation pour l'analyse en chambre de sédimentation

Le remplissage de la chambre doit se faire aussitôt après l'homogénéisation (pour éviter d'exclure du prélèvement des taxons sédimentant rapidement). Il doit se faire rapidement en une seule fois, jusqu'à l'obtention d'un léger excès d'eau provoquant un ménisque convexe à la surface de la chambre. Ce surplus d'eau est aussitôt chassé avec le glissement de la lame supérieure, tout en faisant attention à ne pas enfermer de bulle d'air dans la chambre. Il est en même temps épongé par un papier absorbant.

Il faut veiller à ce que le surplus d'eau ne s'écoule pas le long de la chambre, faisant courir le risque qu'un écoulement sous la lamelle d'observation, ne la salisse, et nuise à l'observation à venir.



Figure 6 : photo d'une chambre de sédimentation en préparation pour analyse

La sédimentation doit se dérouler sur un plan horizontal de faible chaleur massique (par exemple une fine plaque en acrylique, en bois, en cellulose...), à l'abri de la lumière directe et à une température ambiante constante. Les vibrations sont à proscrire.

Volume de la chambre mL	Hauteur de la chambre cm	Temps de sédimentation h
10	2	8
25	5	12
50	10	24
100	20	48

Tableau 1 : temps de sédimentation en chambre pour les échantillons lugolés

NB : Ces temps de sédimentation prennent en compte la totalité des espèces présentes, y compris jusqu'aux plus petites. C'est pourquoi il peut être admis, pour une finalité analytique centrée surtout sur le microplancton (cas du REPHY), de prendre en compte les durées proposées par Lundt et al. (en 1958), qui proposent une durée **de 3 h pour une chambre de 10 mL**. En cas de constat de présence nanoplanctonique devant être quantifiée, cette durée devra être réévaluée selon le tableau ci-dessus.

L'expérience montre que certaines espèces (en particulier pour le microplancton) peuvent sédimenter assez vite. Cette propriété permet aux observateurs du REPHY, dans des cas pour lesquelles il est utile d'évaluer rapidement une densité cellulaire d'espèces cibles (toxiques ou nuisibles) par rapport à un seuil d'alerte, de procéder à un examen préliminaire dans un temps inférieur à celui du temps de sédimentation recommandé ci-dessus. En effet, dès que le seuil concerné est franchi, ce dépassement ne pourra qu'être confirmé lors du comptage final. Cette pratique peut être particulièrement applicable pour les *Dinophysis*.

## 7 IDENTIFICATION ET DÉNOMBREMENT

L'identification des cellules repose sur l'observation visuelle des caractères généraux et des attributs morphologiques remarquables des cellules, soit par comparaison aux documents de référence en s'appuyant aussi sur les textes d'accompagnement des illustrations (liste non exhaustive des documents en ANNEXE IV), soit à l'aide de clés d'identification, ceci, accompagné de la connaissance :

- des espèces caractéristiques de la région échantillonnée
- des variations morphologiques au sein d'une même espèce
- des données environnementales liées à l'échantillon analysé (température, salinité ...)

Il est à noter que bon nombres de caractères sont plus visibles sur du matériel frais (vivant) que fixé et qu'en conséquence, une observation préliminaire d'échantillon frais constitue une source d'information très précieuse au niveau taxinomique.

Trois stratégies d'analyses sont appliquées dans le cadre du REPHY (FLORTOT, FLORIND, FLORPAR cf. Cahier de Procédure REPHY en vigueur) :

Quelle que soit la stratégie, le résultat final du dénombrement dans la chambre de sédimentation est converti pour obtenir une concentration en nombre de cellule par litre.

Les résultats des observations sont consignés sur une fiche de résultat du système documentaire du laboratoire. Un exemple de fiche est proposé en ANNEXE V. Toutes les informations permettant de retrouver le volume élémentaire dans lequel le dénombrement a été effectué (volume de la cuve ou partie de cuve, nombre de transects, nombre de champs oculaires, grossissement de l'objectif adopté, ...), y seront renseignés, ce qui permet, si nécessaire, d'évaluer la précision des comptages.

## 7.1 FLORES TOTALES (FLORTOT)

C'est l'identification et le dénombrement de toutes les cellules phytoplanctoniques présentes dans la chambre de sédimentation et pouvant être identifiées dans les conditions d'observation, c'est à dire globalement toutes les cellules dont la taille est supérieure à 20 µm, et celles dont la taille est inférieure mais qui sont en chaîne ou colonie. Les cellules plus petites sont dénombrées seulement quand elles sont potentiellement toxiques ou qu'elles présentent de fortes abondance (> 100 000 cellules/L).

D'une manière générale, le zooplancton tel que les tintinnidés (Ciliophora), les larves de coquillage ou de poisson ne sont pas dénombrés. Toutefois, *Mesodinium rubrum* qui fait partie des Ciliophora fait l'objet d'une attention particulière car d'une part, il intervient dans la chaîne trophique de *Dinophysis*, et, d'autre part, il peut provoquer une coloration rouge vif des mollusques (cf. fiche MESORUB du classeur : Guide pratique à l'usage des analystes du phytoplancton – E. Nézan et G. Piclet ISBN 2-910373-21-5). Comme ils s'avèrent difficile à reconnaître, tous les ciliés d'une morphologie approchante dénombrés sont saisis sur le taxon Ciliophora ou, s'il est formellement identifié, son dénombrement est saisi sur le taxon *Mesodinium rubrum*.

## 7.2 FLORES PARTIELLES INDICATRICES (FLORIND)

C'est l'identification et le dénombrement à minima de toutes les espèces présentes dans la chambre de sédimentation à une concentration supérieure à 100 000 cellules par litre, toxiques ou non ; et des genres ou espèces des : *Alexandrium*, *Dinophysis* et *Pseudo-nitzschia*.

Tous les genres ou espèces cités dans le catalogue des micro-algues toxiques, nuisibles ou douteuses du site de IOC-UNESCO (IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae - a product of the [IOC Harmful Algal Bloom Programme](http://www.marinespecies.org/hab/) and the [World Register of Marine Species](http://www.marinespecies.org/hab/). <http://www.marinespecies.org/hab/>) peuvent être ajoutés aux dénombrements, quelles que soient leurs concentrations.

Une attention particulière est portée sur la liste des taxons "cibles" de France qui comprend entre autres : *Ostreopsis ovata*, *O. siamensis*, *Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum*, *Protoceratium reticulatum*, *Vulcanodinium rugosum*, *Karenia mikimotoi*, *Prorocentrum lima*.

Ces taxons sont difficiles à identifier avec certitude en microscopie photonique. Si leur identification est certifiée par des techniques complémentaires, le dénombrement est saisi au niveau de l'espèce, dans le cas contraire la saisie se fait au niveau du genre (à l'exception de *Gonyaulax spinifera* cf. ANNEXE III).

Les genres *Karenia*, *Heterocapsa*, *Fibrocapsa* et *Pseudochatonella* renferment des espèces ichtyotoxiques qui peuvent avoir un impact sur la faune en cas de bloom. De tailles inférieures à 20 µm, ils sont difficiles à reconnaître en microscopie photonique. Toutefois en cas de prolifération massive, l'observateur est alerté et peut solliciter une expertise, le cas échéant.

## 7.3 FLORES PARTIELLES (FLORPAR)

Ce sont des flores simplifiées pour lesquelles aucune contrainte n'est imposée et pouvant être réduites au dénombrement dans la chambre de sédimentation d'un seul taxon cible.



## 7.4 MODE OPERATOIRE DES COMPTAGES

### 7.4.1 RECOMMANDATIONS

Il convient de ne pas identifier les taxons à un niveau de précision supérieur à celui maîtrisé par l'analyste. Toutefois afin de conserver un maximum d'information, et de ne pas remonter à un niveau supérieur trop vaste et souvent peu informatif, des taxons virtuels ont été créés dans le référentiel de Q<sup>2</sup>, aussi, certains taxons du référentiel, sont considérées comme un groupe d'espèces de morphologie identique en microscopie photonique constituant le complexe de cette espèce.

Les cellules de taille inférieure à 20 µm ne sont pas à dénombrer, à l'exception des abondances exceptionnelles de certains taxons nuisibles comme *Phaeocystis*, ou potentiellement toxiques comme *Chysochromulina* ; sensu lato : les dinoflagellés nanoplanctoniques et les Cyanophyceae sont à enregistrer (cf. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae).

Du fait des limites de résolution liées à l'optique, l'identification de certains taxons reste forcément limitée en microscopie photonique. Le tableau en ANNEXE III liste quelques exemples et le ou les choix de saisie à appliquer.

#### *Comptage de cœnobes, phycomes, colonies et filaments*

Selon la norme NF EN 15204 p15, point 7.3.2.4 : "il convient de traiter les cœnobes comme une seule unité". Ces associations de cellules appelées cœnobes correspondent à une unité dans laquelle on reconnaît une harmonie et une solidarité fonctionnelles entre les individus (définition Encyclopaedia universalis). Exemples : *Senedemus* et *Pediastrum* (cf. illustrations p.70 - Nézan E., 1996. Surveillance du phytoplancton marin - les principales classes hormis les diatomophycées. Manuel illustré pour la formation des opérateurs de laboratoires)

Un cœnobe est donc compté comme une seule unité et non comme des cellules en colonie.

Pour les genres *Halosphaera*, *Pachysphaera* et *Pterosperma* (classe des Prasinophyceae), seuls les phycomes (stade non mobile du genre) sont détectables et identifiables (cf. Manuel illustré E. Nézan, 1996 p. 68). Dans ce cas, seul les phycomes sont dénombrés et un commentaire est ajouté sur la données saisie dans Quadrigé : "Le dénombrement ne correspond pas au nombre de cellule, mais au nombre de phycomes (stade non mobile du genre)."

Les comptages de colonies entières peuvent être effectués en appliquant les mêmes règles.

En règle générale, on dénombre toutes les cellules au sein d'une colonie ou d'un filament. On peut alors utiliser des approches différentes :

- Comptages directs de cellules — Les cellules des colonies et des filaments sont comptées, comme s'il s'agissait de cellules individuelles, en ne comptant que les cellules qui se trouvent dans le champ.
- Comptages séparés du nombre de colonies/filaments et du nombre moyen de cellules par colonie/filament — Le nombre d'objets algaux (colonies/filaments entiers et cellules individuelles du même taxon) est compté normalement, avec un comptage séparé du nombre de cellules dans au moins 30 objets. Le nombre moyen de cellules par objet multiplié par le nombre d'objets permet d'obtenir le nombre total de cellules. Cette méthode ne peut être utilisée que lorsque le nombre de cellules par objet ne varie pas largement dans l'échantillon (*Phaeocystis*, *Microcystis*, *Merismopedia*, *Cyanophytes*...).

---

### *Comptage dans les cas particuliers*

#### Cellules en division

Lorsque l'observation montre des cellules en division, on dénombre alors les cellules en considérant que la phase de division est achevée (une cellule en division = deux cellules).

#### Etat physiologique et diversité morphologique au sein d'une même espèce

Les frustules de diatomées ou thèques vides de dinoflagellés ne sont normalement pas comptés. Par contre, ils peuvent être utiles pour observer des détails morphologiques et identifier certaines espèces surtout les plus abondantes de l'échantillon analysé. Par ailleurs, si l'abondance de ces enveloppes vides témoigne de la fin de la floraison d'une espèce donnée qui n'a pas été détectée lors de l'échantillonnage précédent, il faut les compter.

Les cellules brisées ayant conservé leur contenu cellulaire sont comptées en reconstituant une cellule entière (2 demi cellules = 1 cellule) cas de cellules longues et fines (*Rhizosolenia*, *Proboscia*...)

#### Cas des *Pyrocystis* (syn : *Dissodinium*)

Seuls les kystes secondaires, en forme de croissant et renfermant une ou plusieurs spores ressemblant à des cellules de *Gymnodinium*, sont aisément reconnus. Chaque spore est comptée (cf. A. Sournia, 1986 – Atlas du phytoplancton marin p 49).

Quelques exemples sont illustrés en ANNEXE III.

## 7.4.2 OPÉRATION PRELIMINAIRE

### Distribution aléatoire des particules

La première opération à réaliser au début d'une observation est une observation rapide ou "survol" de la cuve au plus faible grossissement, afin d'évaluer le mode global de distribution des particules.

On peut ainsi avoir une idée de la charge générale en particules de l'échantillon (matières en suspension + plancton) et de la possibilité d'en réaliser "la lecture" au microscope :

- si la charge particulaire est trop élevée, la fiabilité de l'identification et du dénombrement des espèces phytoplanctoniques sera compromise : on pourra alors procéder à une éventuelle dilution de l'échantillon, ou à une filtration de l'échantillon avec une maille de filtration choisie en fonction de la taille des particules observées.
- si la cuve n'est pas trop chargée, des modes de distribution à grande échelle peuvent facilement être observés, bien que les particules les plus petites puissent passer inaperçues. La répartition idéale correspond à celle du schéma ci-dessous.

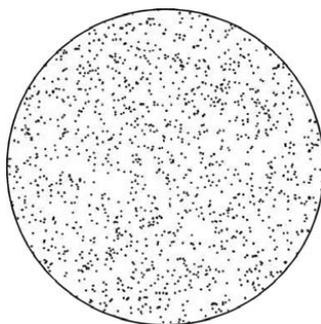


Figure 8 : image illustrant une distribution aléatoire des particules dans le fond de la cuve à sédimentation

Ce mode de répartition autorise en effet un traitement statistique robuste des dénombrements permettant en particulier d'avoir, si nécessaire, une information fiable sur la précision du comptage. Ces aspects sont développés au point 8.1, et précisés en 0.

### Perturbation du mode de répartition dans la chambre de sédimentation

Le mode de distribution le plus souvent observé, lorsque la température n'est pas contrôlée, est une distribution de type concentrique dans laquelle les particules les plus grandes et les plus lourdes ont tendance à se concentrer vers la paroi de la chambre et les particules les plus petites plutôt vers le centre de la chambre. Ce mode apparaît lorsque la température de la chambre est supérieure à celle du sous-échantillon.

Si le sous-échantillon présente une température supérieure à la chambre au moment où il y est versé, le mode inverse se produit avec les particules les plus petites près de la paroi de la chambre.

### 7.4.3 STRATÉGIE DE DENOMBREMENT

Le comptage des espèces phytoplanctoniques est une opération coûteuse en temps, aussi il convient d'optimiser la méthode appliquée tout en conservant la meilleure précision possible.

Le comptage consiste à enregistrer les taxons observés et le nombre d'unités d'algues (cellule) de chaque taxon (excepté pour les coenobes qui sont traités comme une seule unité) dans une zone de surface connue de la chambre de sédimentation ou dans la chambre entière.

De même que la surface totale de la chambre correspond à un volume connu (par exemple 10, 20 ou 25 mL), des surfaces élémentaires correspondant à des sous-échantillonnages de la chambre doivent être transformées dans les volumes correspondants. Ceci doit être réalisé lors de la mise en service du microscope, pour chaque mode de sous-échantillonnage, et pour chaque type d'oculaire et d'objectif utilisé (cf. ANNEXE II).

Les principaux modes de sous-échantillonnage sont :

- le comptage d'un nombre de champs choisis aléatoirement,
- le comptage de transects,
- le comptage de la  $\frac{1}{2}$  chambre,
- le comptage de la chambre entière.

Habituellement, les organismes planctoniques sont comptés dans l'ordre de leur apparition dans le champ de vision. Ceci n'est pas toujours pratique. En se concentrant seulement sur une forme spécifique, la reconnaissance est plus certaine et grandement facilitée. Ainsi, le gain de temps justifie une division de la tâche de comptage, de sorte que les variétés abondantes sont comptées séparément dans un sous-échantillonnage de la chambre.

Dans tous les cas, *in fine*, toute la surface de la cuve doit être balayée pour ne pas omettre les cellules rares.

Il est très important de se rappeler qu'il est préférable d'identifier correctement les microalgues à un niveau taxonomique supérieur (e.g. Famille, Ordre) plutôt que de les identifier de façon incertaine à un niveau inférieur (e.g. genre, espèce).

*Le comptage d'un nombre de champs choisis aléatoirement*

Ce mode de comptage sera préférentiellement utilisé pour dénombrer les espèces représentées en abondance dans l'échantillon (cas des efflorescences) avec des occurrences par champ  $\geq 100$ . Il peut se faire en positionnant de manière aléatoire l'objectif sur le fond de la chambre, sans regarder dans l'oculaire. Le champ optique "lu" est le champ oculaire total, sans que celui-ci soit bien sûr déplacé. Le nombre total de champs comptés est noté et le calcul de l'abondance par litre est effectué à partir du nombre moyen par champ.

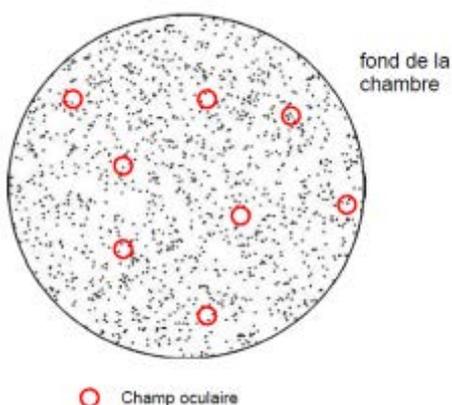


Figure 9 : image illustrant un choix aléatoire de champs oculaires dénombrés sur le fond de la chambre à sédimentation

Lors de l'utilisation de comptage par champ oculaire d'un microscope, il est important de s'assurer de la cohérence de la méthode utilisée pour déterminer quels objets algaux se trouvent dans le champ et hors du champ. Il convient de mettre en place une règle simple, telle que celle décrite sur les figures suivantes, applicable en particulier pour les grosses cellules, les colonies ou les coenobes.

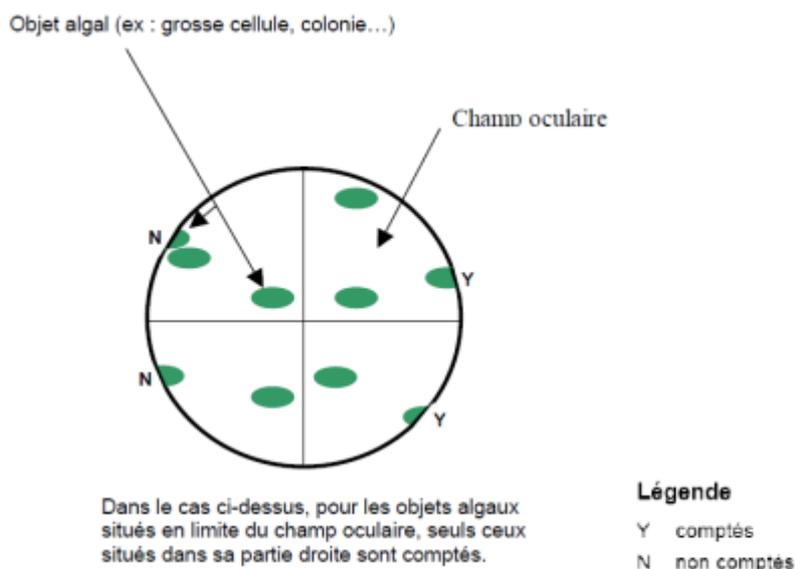


Figure 10 : image illustrant le choix de dénombrer une particule lorsque celle-ci n'apparaît pas entièrement dans le champ



### *Le comptage par transects*

Ce mode de comptage est intéressant pour des espèces assez bien représentées dans la chambre. Il est valable si la répartition est aléatoire, et il offre aussi l'avantage, par rapport à un comptage par champs aléatoires (cf. ci-dessus), de compenser la perturbation par une répartition concentrique liée à des influences thermiques, telles que décrites plus haut.

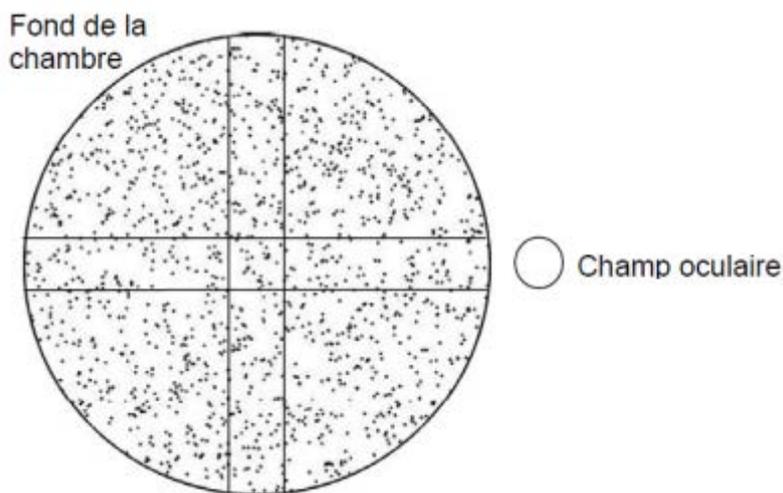


Figure 11 : image illustrant un transect sur le fond d'une chambre de sédimentation

Afin d'obtenir un nombre d'objet algaux  $\geq 100$ , il convient d'ajouter un nombre adéquat de transects de lecture, en général un ou deux. Dans ce cas, il est utile de mettre des repères sur la base de la chambre pour faciliter les nouveaux positionnements. En ce qui concerne le risque de comptages répétés au lieu du croisement des transects (centre de la cuve), il n'y a pas lieu de s'en soucier pour les espèces abondantes et réparties aléatoirement. Par contre, les espèces rares doivent être repérées à cet endroit et ne doivent pas être comptabilisées plusieurs fois (ce qui ne pose en général pas de problème, l'analyste ayant bien identifié l'espèce rare, sa position et son environnement au premier passage, la reconnaîtra aux passages suivants).

Pour les organismes solitaires de petite taille ( $< 15 \mu\text{m}$ ), en cellules isolées (cas des Cryptophyceae par exemple) qui ne sont correctement reconnaissables qu'à l'objectif x 40, pour des raisons de durée d'analyse, il n'est pas envisageable d'effectuer leur dénombrement à l'objectif x 40 sur toute la cuve. Leur comptage peut être effectué sur un ou plusieurs transects avec un minimum d'individus à compter de 30 cellules. On se contente alors d'un intervalle de confiance de 37% (cf. 0), l'information sur les variations temporelles des abondances du point suivi restant intacte.

### *Le comptage de la chambre entière*

Le comptage dans la chambre entière est obligatoire pour les taxons en faible quantité, ou pour compter des taxons de grande taille dont la distribution peut ne pas être aléatoire dans la chambre.

#### 7.4.4 MODE OPÉRATOIRE

La lecture d'une cuve complète se fait par déroulement (horizontal ou vertical) du champ oculaire. Le basculement d'un niveau à l'autre se fait grâce à des repères identifiés (objet caractéristique sur le fond de la cuve).

Les organismes caractéristiques en limite de champ pourront aisément ne pas être comptabilisés deux fois : pour éviter tout double comptage, on peut opter pour le comptage de celles qui sont repérées sur l'une des limites, et pas sur l'autre où elles seront prises en compte au passage suivant.

La première étape consiste à positionner la cuve de manière à ce que l'objectif coïncide avec le départ d'un diamètre de la cuve. L'analyste choisit la position de départ qui lui convient soit : à gauche, à droite, en haut ou en bas.

Le transect/diamètre est balayé successivement avec les objectifs x 40, x 20 ou x 10. L'objectif x 40 permet d'observer et de détecter les taxons de petite taille, et de dénombrer ceux dont l'occurrence est supérieure à 100 sur le diamètre.

Une fois le diamètre balayé successivement avec les trois objectifs, et, le cas échéant, les comptages des transects et/ou des champs terminés (cas des taxons dont l'occurrence moyenne par champ est > 100), deux méthodes peuvent être appliquées :

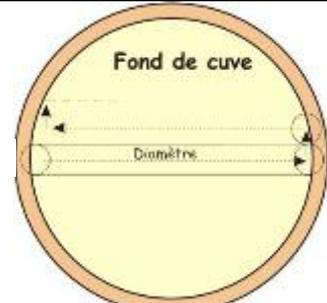
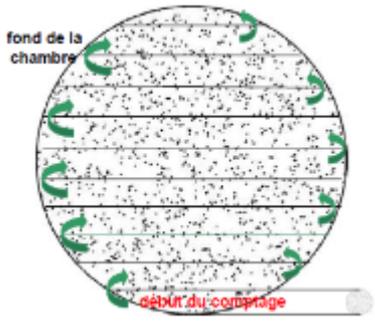
 <p>Fond de cuve</p> <p>Début du comptage →</p> <p>Diamètre</p>	<p>1/ On revient à la position de départ avec l'objectif x 20 pour effectuer un dénombrement de tous les taxons (exceptés ceux qui ont été comptés sur les sous échantillonnages), d'abord sur une première demi-surface de la cuve. L'autre demi-surface n'est balayée que pour les taxons ayant présenté des occurrences &lt; 100.</p>
 <p>fond de la chambre</p> <p>début du comptage</p>	<p>2/ On démarre le balayage de la cuve en haut ou en bas si on avance horizontalement, à droite ou à gauche si on avance verticalement selon la préférence de l'analyste.</p> <p>Arrivé au diamètre, les taxons dont l'occurrence est &gt;100 ne sont plus comptés dans la demi-cuve restante.</p>

Figure 12 : images illustrant deux méthodes de balayage de la chambre à sédimentation pour un dénombrement sur la 1/2 cuve et la cuve entière

## 8 VALIDATION DES RÉSULTATS

### 8.1 VALIDATION QUANTITATIVE

Afin de limiter au maximum l'incertitude sur le résultat quantitatif, les chambres de sédimentation doivent être certifiées par le constructeur ou faire l'objet d'un contrôle métrologique. Ce contrôle porte sur le volume et le diamètre des cuves.

L'incertitude quantitative la plus élevée affecte les taxons dont l'abondance est la plus faible. Afin de minimiser cette incertitude, l'écart du volume mesuré de la cuve par rapport au volume attendu ne devrait pas dépasser 5 % (valeur fixée arbitrairement car il n'existe pas de recommandation précise. Cela donne une tolérance inférieure à 0,5 ml pour une cuve de 10 ml).

Les cuves ne répondant pas à ce critère sont, soit écartées du matériel utilisé, soit leur volume réel est utilisé pour les calculs des abondances.

Celles dont le volume est supérieur à celui attendu peuvent éventuellement être rectifiées par abrasion au papier de verre très fin. Chaque cuve doit être identifiée pour assurer la traçabilité.

L'échelle micrométrique oculaire du microscope doit être étalonnée pour toutes les conditions d'observation (différents grossissements des objectifs, présence de dispositifs optiques intermédiaires...). Ceci afin de maîtriser les mesures des tailles des cellules ou colonies, mesures indispensables dès lors que l'on veut confirmer la démarche d'identification.

La valeur du diamètre de la cuve sert à calculer la surface d'un transect (valeur du diamètre de l'objectif x valeur du diamètre de la cuve).

Les surfaces des champs de chaque objectif doivent être calculées à partir des mesures de leurs diamètres. D'abord on étalonne le micromètre oculaire, puis on mesure les diamètres des champs pour chaque objectif à l'aide du micromètre oculaire (voir ANNEXE II).

Ceci permet de déterminer les coefficients à appliquer pour calculer les concentrations en nombre de cellules par litre, lorsque le comptage a été effectué sur un sous échantillonnage de la cuve (champ, transect...),

Chaque laboratoire élabore, pour chacun des microscopes utilisés, un tableau de transformation des nombres de cellules phytoplanctoniques comptées, en nombre de cellules par litre. Chaque tableau renseigne, pour chaque mode de sous-échantillonnage pratiqué (transects ou champs aléatoires) et chaque grossissement utilisé, en fonction du nombre d'opérations pratiquées le rapport multiplicatif qui amène au nombre de cellules par litre. Cette démarche est présentée en ANNEXE II.

En cas d'utilisation d'un compteur manuel, son bon fonctionnement doit être contrôlé et il doit être remis à zéro avant toute utilisation.

Tous les résultats des contrôles métrologiques sont enregistrés selon les procédures internes au laboratoire.

Les calculs finaux des résultats par taxon en nombre de cellules par litre doivent être vérifiés avant saisie dans la base Quadrige.

Toutes les informations qui ont permis les calculs des abondances et qui sont enregistrées dans la fiche de résultat, permettront, si nécessaire, d'évaluer la précision des comptages.

## 8.2 VALIDATION QUALITATIVE

Les analystes suivent une procédure d'habilitation, de maintien de l'habilitation et, le cas échéant, de réhabilitation. Ces procédures sont décrites au point 10.

Dans les cas où l'analyste est confronté à l'impossibilité d'identification de cellules jamais observées, ou de cellules nécessitant une expertise plus poussée, il fait appel au réseau d'observateurs du REPHY, ou aux experts de la communauté scientifique du domaine, et plus particulièrement aux taxinomistes du laboratoire Ifremer de Concarneau, Elisabeth Nézan, Nicolas Chomérat et Kenneth Nertens.

Dans un premier temps, il devra adresser par mail des images (format jpg) accompagnées d'un minimum d'informations relatives à la taille des cellules ainsi qu'à l'échantillon source (non fixé, lugolé, formolé) et au prélèvement (date, lieu, température, salinité). Si un examen approfondi s'avère nécessaire, il devra expédier un sous-échantillon à l'assistance. Cette expertise n'est utile que lorsque l'espèce présente une forte abondance ou pour les espèces potentiellement toxiques ou nuisibles. Dans les autres cas, l'observateur identifie au rang supérieur le plus sûr.

## 9 BANCARISATION DES DONNEES DANS QUADRIGE

### *Saisie et validation des données*

Pour les saisies dans la base de données Quadriges se référer au document de prescription : Quadriges<sup>2</sup> - Manuel de saisie pour les programmes REPHY et REPHYTOX (version en cours). Ici sont traités les points qui ne figurent pas dans le manuel.

Les **résultats** calculés des densités en nombre de cellules par litre sont saisis sans décimale et, arrondis avec, au maximum, 4 chiffres significatifs.

#### EXEMPLE :

Résultat calculé	Résultat à saisir
40	40
180	180
1 240	1 200
25 680	25 700
166 440	166 400

Tableau 2 : exemples d'arrondis des résultats en nombre de cellules par Litre pour la saisie dans Quadriges

Lorsqu'une flore partielle a été réalisée en raison des délais de rendu de résultats imposés pour la surveillance sanitaire, puis une flore totale sur le même échantillon, il est recommandé de saisir les deux flores réalisées (FLORTOT et FLORPAR ou FLORIND). Ceci permet de rendre compte du nombre d'analyses réellement réalisés.

**Pour les FLORIND**, la liste des taxons à saisir obligatoirement même si leur concentration = 0 est : *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Pseudo-nitzschia*.

## Vérification – contrôle - validation

Toutes les données des documents d'enregistrement du laboratoire doivent être **vérifiées** avant saisie. Particulièrement les calculs des abondances de cellules.

Après saisie, les données de la base doivent être **contrôlées** avant validation. Pour ces contrôles, Il convient de vérifier si toutes les données de la base sont égales à celles notées dans les documents d'enregistrement du laboratoire et si toutes les données existantes dans les documents du laboratoire, sont bien présentes dans la base.

Il convient d'utiliser les documents d'enregistrement initiaux du laboratoire pour ces contrôles. Particulièrement : les étiquettes ou autres documents d'identification des prélèvements d'échantillon pour la partie [Passage-prélèvement-échantillon] et les originaux des fiches de résultat pour la partie [Résultat].

Il convient de tracer les vérifications et contrôles.

Lorsque tous les documents ont été comparés, si besoin, les corrections sont réalisées. Le cas échéant, un contrôle des corrections est effectué.

Lorsque toutes les données sont correctes dans la base QUADRIGE<sup>2</sup>, elles sont **validées** (au sens quadrigé) ce qui les rend disponibles au delà du producteur de la données et notamment dans SURVAL. Toutefois, ces données ne sont pas qualifiées, c'est pourquoi, en cas de fourniture de données à un utilisateur extérieur, l'envoi doit toujours être accompagné d'un message avertissant le destinataire que l'utilisation de ces données est sous sa responsabilité, en lui demandant de citer la source de la façon suivante :

*« Ces données devront être citées comme : **données Ifremer/Quadrige<sup>2</sup>/Rephy**. L'utilisation de ces données et leur traitement sont sous votre responsabilité ».*

Et si les données ne sont pas toutes validées et/ou qualifiées, il faut ajouter la mention suivante :

*« **Attention**, ces données n'ont pas encore été toutes qualifiées, certaines d'entre elles ne sont pas encore validées, elles sont donc susceptibles de contenir des erreurs. L'utilisation de ces données et leur traitement sont sous votre responsabilité ».*

---

### Référentiel taxinomique

Le référentiel taxinomique de la base Quadrige<sup>2</sup> est maintenu conforme au Worms<sup>2</sup>. Lorsque une mise à jour est réalisée par la cellule Q<sup>2</sup>, celle ci impacte également les données déjà saisies. Un commentaire est ajouté sur la donnée renseignant le précédent nom de taxon qui avait été saisi.

---

<sup>2</sup> WoRMS : World Register of Marine Species - <http://www.marinespecies.org/index.php>

## 10 GESTION DES COMPÉTENCES ET HABILITATION

Les responsables des laboratoires doivent s'assurer de la compétence de leur personnel et conserver un dossier d'habilitation par agent.

Le personnel opère les analyses avec une compétence qui s'appuie sur :

1. **des documents** présents dans les locaux : clés d'identifications, ouvrages, guides et flores, documents élaborés par le laboratoire lui-même (compilations photographiques, dessins...) cf. liste non exhaustive en ANNEXE IV ; sur des études portant sur l'ensemble des résultats acquis.
2. **des moyens en expertise** : avec la mise en place, à Concarneau, d'un pôle d'expertise en soutien à la taxinomie du phytoplancton, et d'une procédure d'échange d'information en temps réel, afin de permettre l'expertise sur les échantillons, comme le permettent aujourd'hui les moyens de photographie numérique et d'échange internet. (cf. Cahier de Procédures REPHY).  
L'envoi des échantillons eux-mêmes à Concarneau permet de lever les doutes avec l'utilisation de techniques plus fines que les laboratoires côtiers n'ont pas toujours vocation à acquérir.
3. **des formations et par l'usage d'outils d'auto formation** : formations internes (en particulier avec l'appui du pôle d'expertise de la station Ifremer de Concarneau pour les aspects taxinomiques), et/ou formations externes ; sur la mise à disposition de divers outils de formation créés à l'Ifremer (diaporamas, rapport et documents, CDRom PhytoQuiz...).
4. **des essais comparatifs inter et intra-laboratoire** : l'ensemble des analystes du REPHY participe tous les trois ans aux exercices d'inter-comparaison organisés par l'unité Phytoplankton du Marine Institute d'Irlande sous couvert du BEQUALM. En interne, des essais inter-analyste d'un même laboratoire sont réalisés régulièrement.
5. **un réseau d'entraide et d'échange d'expériences entre observateurs.**

La qualité des résultats repose sur les compétences du personnel qui réalise les analyses. La taxinomie est un domaine qui demande beaucoup d'investissement personnel et où l'on peut se perfectionner tous les jours.

Pour les analystes débutants une formation initiale est nécessaire et doit être prévue durant l'habilitation initiale.

Les analystes affichant deux ans d'expérience sont considérés comme confirmés toutefois pour le maintien de l'habilitation, des formations régulières sont nécessaires ainsi que la participation à des essais inter analystes (EIA) et inter laboratoire (EIL). Les EIA sont organisés par le laboratoire et les EIL sont coordonnés par la coordination nationale du REPHY.

Les analystes confirmés affichant un arrêt d'activité de plus d'un an doivent participer à un EIA avant de reprendre leur activité, c'est la procédure de ré-habilitation.

Lors des procédures d'habilitation et de re-habilitation, en plus de ces instructions, chaque laboratoire veille au maintien des connaissances du système qualité par le personnel (système documentaire interne et référentiels externes).

## 10.1 HABILITATION INITIALE

- Etape 1 : désignation d'un responsable d'habilitation, et d'un tuteur, par le Responsable du Laboratoire
- Etape 2 : formation au système qualité du laboratoire
- Etape 3 : prise de connaissance de la documentation générale du SMQ et de la documentation spécifique au domaine d'activité
- Etape 4 : tutorat par le personnel habilité du laboratoire et formation(s) initiale(s) par des formateurs experts internes (LER-BO) et/ou externes. Cette étape s'étale sur une durée de un à deux ans
- Etape 5 : examen des connaissances EIA
- Etape 6 : présentation du dossier d'habilitation au Responsable Laboratoire et au RQ par le responsable d'habilitation, après vérification de la conformité aux critères d'habilitation.

Exemple de fiche de suivi des étapes du tutorat :

Tutorat			
Thème	Description	Réalisé le	Acquis le
<b>Avant les essais</b>	Enregistrement des échantillons		
	Connaître les emplacements des différents matériels nécessaires à la réalisation des essais		
	Respecter les règles d'hygiène et de sécurité du laboratoire		
	Préparer les matériels nécessaires aux essais et s'assurer du bon état de fonctionnement des appareils de mesure avant de réaliser les essais		
<b>Durant les essais</b>	Préparer les échantillons d'eau (préparation des cuves à décantation)		
	Analyser les échantillons d'eau (identification et dénombrement des espèces au microscope) => <b>EXAMEN</b>		
	Renseigner les documents d'enregistrement assurant la traçabilité des essais		
<b>Après les essais</b>	Nettoyer et ranger les matériels		
	Saisir les résultats dans la base de données Q <sup>2</sup>		
	Contrôler les enregistrements dans la base de données Q <sup>2</sup>		
	Renseigner les documents de communication des résultats et les adresser au responsable technique.		
Tutorat			
Thème	Description	Réalisé le	Acquis le
Documentation	Consulter les ouvrages d'aide à l'identification disponibles au laboratoire (cf. liste en ANNEXE IV)		
Formation encadrée	Réaliser des observations d'échantillons d'eau au microscope inversé encadrées par au moins un des tuteurs pendant 5 à 6 mois.		

## 10.2 MAINTIEN DE L'HABILITATION

Le maintien d'habilitation est conditionné par :

- La prise de connaissance et revue des créations/modifications de documents de prescription et de méthodes
- La pratique régulière de l'activité avec une période de non pratique ou d'absence maximum tolérable de un an
- La participation à un EIA une fois par an
- La participation à un EIL une fois tous les trois ans.

## 10.3 RE-HABILITATION

La procédure de ré-habilitation consiste en :

- La prise de connaissance des créations/modifications de documents de prescription et de méthodes ainsi que des documents du système qualité du laboratoire.
- La réalisation d'un EIA.

**ANNEXE I. RÉGLAGES DU MICROSCOPE INVERSE (EXEMPLE : OLYMPUS IMT2)**

Exemple pour un **MICROSCOPE INVERSE OLYMPUS IMT2**



Figure 13 : photo d'un microscope inversé (Olympus IMT2)

**Opérations préliminaires**

L'interrupteur de mise sous tension est situé en bas à gauche de l'appareil. Avant de mettre sous tension, diminuer si nécessaire l'intensité lumineuse à l'aide du bouton à molette en bas à droite.

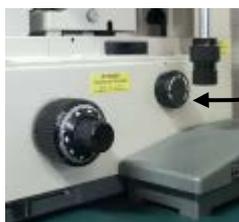
Selon votre morphologie et afin d'obtenir un confort d'observation optimum, faire la mise au point sur un objet à observer, puis procéder aux réglages suivants.

**1/ Réglage de l'écartement oculaire**

Tout en observant dans le tube binoculaire, faire coulisser les montures de manière à adapter l'écartement à votre morphologie. Vous pouvez alors lire votre écartement personnel sur l'échelle entre les oculaires.

**2/ Réglage à votre vision**

Il est possible de régler les oculaires pour rectifier l'éventuelle asymétrie de l'acuité visuelle.



Tourner le sélecteur de lumière sur la position **OM** .

Faire la mise au point en regardant uniquement par l'oculaire droit

puis observer avec les deux oculaires et tourner la bague de correction de l'oculaire gauche jusqu'à l'obtention d'une croix nette composée de 2 lignes parallèles.



Remplacer le sélecteur de lumière sur la position **BI**.

Figure 14 : illustrations pour le réglage de la vision sur le microscope Olympus IMT2

L'IMT-2 se dérègle très facilement, ne pas hésiter à effectuer périodiquement les réglages suivants.

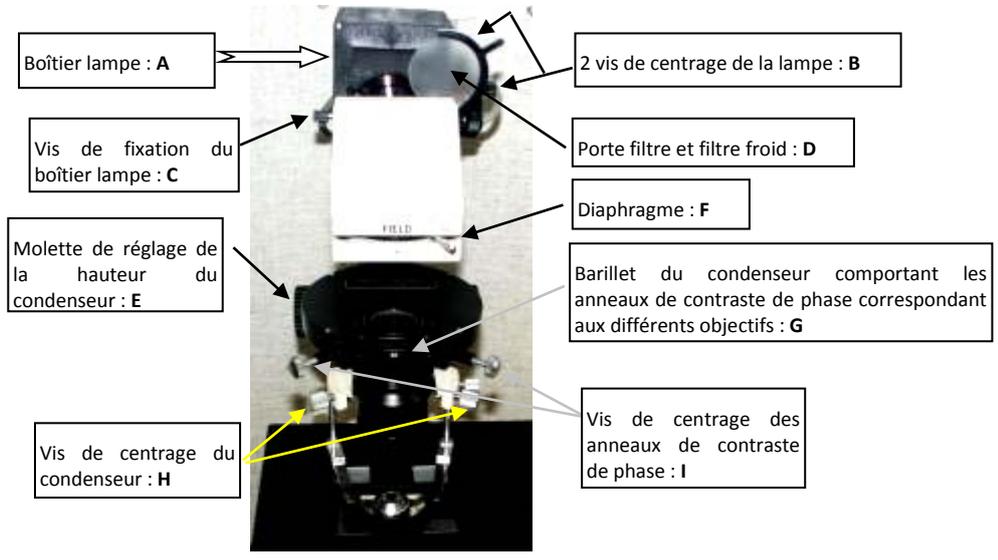


Figure 15 : illustration de la source d'éclairage et du condenseur

**3/ Centrage du condenseur**

Positionner le barillet du condenseur ( G ) en position "○ ⊗". Faire une mise au point sur un objet à observer avec l'objectif x 10. Fermer le diaphragme de champ ( F ) en poussant le levier complètement à droite. Régler la hauteur du condenseur ( E ) jusqu'à obtention de l'image nette de la lumière du diaphragme. Centrer cette image à l'aide des vis ( H ). Rouvrir le diaphragme de champ jusqu'à atteindre la tangente du champ d'observation

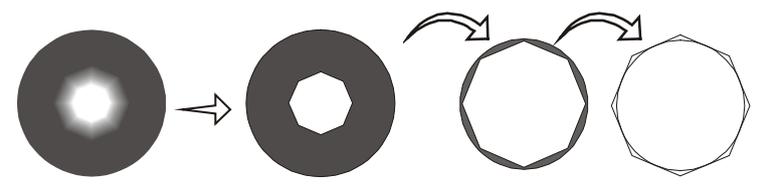


Figure 16 : illustration pour le centrage du condenseur

**4/ Centrage du filament de la lampe**



- A faire sans objet sur la platine d'observation.
- Le condenseur ( **G** ) toujours en position "   ".
- Positionner la couronne de grossissement sur **CT**.
- Relever le filtre froid ( **D** ). L'image du filament de la lampe apparaît.
- Faire une mise au point avec la bague **FOCUS**. Agir sur les vis **B** pour centrer le filament. Repositionner le filtre froid.

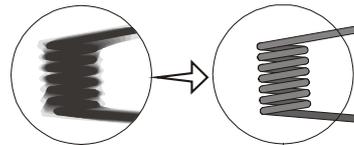
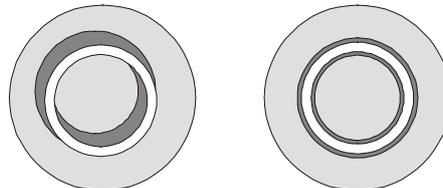


Figure 17 : illustrations pour le centrage du filament de la lampe

**5/ Réglage des anneaux de phase**

Avec le barillet **G**, sélectionner l'anneau de phase correspondant à l'objectif utilisé.

La couronne de grossissement toujours sur **CT**, faire la mise au point avec la bague **FOCUS**. L'image de l'anneau apparaît plus ou moins bien centrée.



Centrer l'anneau lumineux à l'aide des vis **I**.

Figure 18 : illustration pour le centrage des anneaux de phase

Repositionner la couronne de grossissement sur **1X**

**6/ Réglage affiné des objectifs x 20 et x 40 possédant une bague de correction**

La définition de l'image obtenue avec des objectifs x 40 (et certains x 20) est très affectée par l'épaisseur du fond de cuve. Le réglage optimum est obtenu en agissant sur la bague de l'objectif lui-même tout effectuant la mise au point sur l'objet en continu.

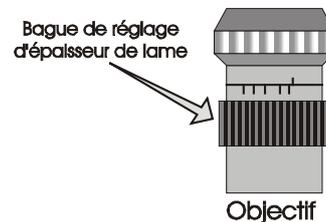


Figure 19 : schéma d'un objectif avec bague de correction

## ANNEXE II. ÉTALONNAGES

- Mesurer au pied à coulisse le diamètre des cuves. En général et quasiment toujours, elles mesurent 24 mm de diamètre. Calculer la surface de la cuve. Pour un diamètre de 24 mm, la surface est de  $452\,389\,342\ \mu\text{m}^2$ . Le nombre de cellules comptées sur cette surface correspond donc au nombre de cellule présentes dans le volume de la cuve.
- Etalonner le micromètre oculaire pour chaque objectif et combinaison optique (dans le cas de bague de grandissement supplémentaire) à l'aide d'une lame micrométrique étalon, en superposant les graduations de l'oculaire à celles du micromètre étalon placé sur la platine.

Il existe des lames micrométriques de 1, 2 ou 50 mm. Sur la lame micrométrique, 100 graduations = 1 mm. Entre deux graduations il y a donc  $10\ \mu\text{m}$ .

Aligner et orienter les deux graduations de manière à faire coïncider l'origine du micromètre étalon à une graduation de l'oculaire.

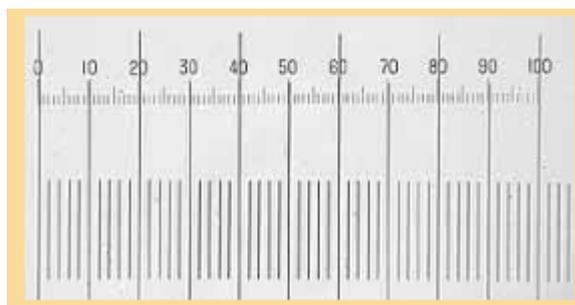


Figure 20 : image de correspondance entre le micromètre oculaire et le micromètre objet de la lame étalon

Noter le nombre de graduations de l'oculaire correspondant à 100 graduations de l'étalon (ou au nombre de graduations apparaissant dans le champ selon le grossissement utilisé) et en déduire la valeur d'une division de l'oculaire. Ces résultats permettront de mesurer avec précision les cellules observées.

- Mesurer le diamètre des champs pour chaque grossissement à l'aide de la lame micrométrique étalon. Avec l'objectif x 10, le micromètre étalon ne couvre pas tout le champ. Pour mesurer le diamètre du champ, utiliser le micromètre oculaire, maintenant étalonné, mesurer la distance entre deux objets repérés de part et d'autre du diamètre du champ (par exemple, en utiliser du papier calque millimétré ou des objets algaux ou particules du fond d'une cuve).
- Calculer les surfaces des champs pour chaque grossissement. Etablir les facteurs à appliquer pour rapporter le nombre de cellule comptées dans le champ à la surface de la cuve puis rapporter au litre et ceci pour chaque grossissement.
- Calculer les surfaces des transects diamètre pour chaque grossissement.
- Établir les facteurs à appliquer pour calculer les concentrations en nombre de cellule par litre dans le cas d'un comptage par champ ou par transect, rapporté à la surface de la cuve et donc au volume de la cuve, puis au litre.

Etablir un tableau de correspondance entre le nombre de cellules comptées par sous échantillonnage (transect ou champ) et le nombre de cellule par litre et ceci pour chaque grossissement et chaque volume de cuve.

Consigner tous ces résultats dans une fiche. Cette fiche doit être à disposition des utilisateurs du microscope.

**NB : la lame micrométrique peut également servir à l'étalonnage des échelles générées par les logiciels de traitement des images numériques acquises.**

**Exemples de tableaux de correspondances résultant de l'étalonnage  
 (microscope du LER/MPL site de Nantes) :**

**Etalonnage des micromètres oculaires**

Références du microscope	OBJECTIF x bague	OCULAIRE (nb divisions)	Nb de div correspondant MICROMETRE Leica 11513106	VALEUR d'1 division du micromètre oculaire (µm)
<b>Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224</b>	<b>10 x1</b>	100	99	<b>9,9</b>
	<b>20 x1</b>	100	49	<b>4,9</b>
	<b>40 x1</b>	100	25	<b>2,5</b>

**Mesures des diamètres et calculs des surfaces des champs**

Références du microscope	OBJECTIF x bague	Valeur du diamètre mesuré (mm)	Surface calculée du champ (mm²)
<b>Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224</b>	<b>10 x1</b>	2.16	<b>3,66</b>
	<b>20 x1</b>	1.08	<b>0,91</b>
	<b>40 x1</b>	0.55	<b>0,24</b>

**Calcul des surfaces des transects sur diamètre de la cuve (diamètre champ x diamètre cuve)**

**Le diamètre des cuves est de : 24 mm soit une surface de 452,39 mm²**

Références du microscope	OBJECTIF x bague	Valeur surface transect (mm²)
<b>Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224</b>	<b>10 x1</b>	2,16 x 24 = <b>51,84</b>
	<b>20 x1</b>	1,08 x 24 = <b>25,92</b>
	<b>40 x1</b>	0,55 x 24 = <b>13,2</b>

**Facteurs à appliquer pour le calcul du nombre de cellule par litre**

**Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224**

Aire observée	Notation	Cuve de 10 ml	Cuve de 20 ml	Cuve de 25 ml
Diamètre Objectif X 10	<b>1 ⊖ obj x10</b>	<b>873</b>	<b>436</b>	<b>349</b>
Diamètre Objectif X 20	<b>1 ⊖ obj x20</b>	<b>1 745</b>	<b>873</b>	<b>697</b>
Diamètre Objectif X 40	<b>1 ⊖ obj x40</b>	<b>3 427</b>	<b>1 736</b>	<b>1 370</b>
Demi surface de cuve	<b>½ C</b>	<b>200</b>	<b>100</b>	<b>80</b>
Surface totale de la cuve	<b>1 C</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>40</b>

Facteurs à appliquer pour le calcul du nombre de cellules par litre  
 en fonction du nombre de champs dénombrés

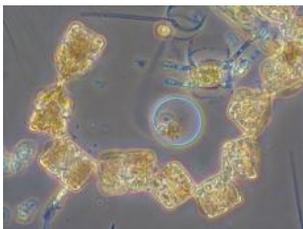
**Microscope Leïca DMI 3000 B – N° 2007-5-224**

Nb de champs	Cuve 10 mL			Cuve 20 mL			Cuve 25 mL		
	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40
1	12 360	49 713	188 495	6 180	24 856	94 247	4 944	19 884	75 398
2	6 180	24 857	94 248	3 090	12 428	47 124	2 472	9 942	37 699
3	4 120	16 571	62 832	2 060	8 285	31 416	1 648	6 628	25 133
4	3 090	12 428	47 124	1 545	6 214	23 562	1 236	4 971	18 850
5	2 472	9 943	37 699	1 236	4 971	18 849	989	3 977	15 080
6	2 060	8 286	31 416	1 030	4 143	15 708	824	3 314	12 566
7	1 766	7 102	26 928	883	3 551	13 464	706	2 841	10 771
8	1 545	6 214	23 562	773	3 107	11 781	618	2 486	9 425
9	1 373	5 524	20 944	687	2 762	10 472	549	2 209	8 378
10	1 236	4 971	18 850	618	2 486	9 425	494	1 988	7 540
11	1 124	4 519	17 136	562	2 260	8 568	449	1 808	6 854
12	1 030	4 143	15 708	515	2 071	7 854	412	1 657	6 283
13	951	3 824	14 500	475	1 912	7 250	380	1 530	5 800
14	883	3 551	13 464	441	1 775	6 732	353	1 420	5 386
15	824	3 314	12 566	412	1 657	6 283	330	1 326	5 027
16	773	3 107	11 781	386	1 554	5 890	309	1 243	4 712
17	727	2 924	11 088	364	1 462	5 544	291	1 170	4 435
18	687	2 762	10 472	343	1 381	5 236	275	1 105	4 189
19	651	2 616	9 921	325	1 308	4 960	260	1 047	3 968
20	618	2 486	9 425	309	1 243	4 712	247	994	3 770

### ANNEXE III. IDENTIFICATION ET COMPTAGE DES CELLULES : CAS PARTICULIERS POSANT QUESTION

Photo : ©Ifremer – Auteur Nadine Masson Neaud

Niveau d'identification

Taxons douteux (tri alphabétique)	Difficultés pour l'identification	Choix à appliquer (saisie dans Q <sup>2</sup> )
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	Deux espèces référencées dans le WoRMS <i>A. glacialis</i> et <i>A. socialis</i> . Mais il semble en exister bien plus	Saisir sur l'espèce <i>Asterionellopsis glacialis</i> . Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être corrigées dans la base
<i>Biddulphia alternans</i> ou <i>Biddulphia</i> sp.	<i>Biddulphia alternans</i> est l'ancien nom de <i>Trigonium alternans</i> ce n'est donc sûrement pas à saisir dans <i>Biddulphia</i> et cette espèce forme des chaînes typiques  	Saisir sur <i>Trigonium alternans</i>
<i>Biddulphia</i> / <i>Odontella</i>	Certaines espèces du genre <i>Biddulphia</i> ont été renommées dans le genre <i>Odontella</i> ( <i>O. aurita</i> , <i>O. mobiliensis</i> , <i>O. regia</i> , <i>O. sinensis</i> ...)	Si l'observateur n'arrive pas à identifier <i>O. aurita</i> , <i>O. mobiliensis</i> , <i>O. regia</i> , <i>O. sinensis</i> , saisir sur <i>Odontella</i> (ordre des Triceraciales) et surtout pas sur <i>Biddulphia</i> (ordre des Biddulphiales) dont le genre répertorie des taxons encore référents ( <i>B. biddulphiana</i> , <i>B. rhombus</i> ...)
<i>Cerataulina pelagica</i>	Cinq espèces référencées dans le WoRMS. <i>C. pelagica</i> est la seule identifiée dans nos eaux	Saisir sur espèce <i>Cerataulina pelagica</i> . Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être corrigées dans la base
Famille des Ceratiaceae : Genres <i>Ceratium</i> , <i>Neoceratium</i> et <i>Tripos</i> .	De nombreuses espèces de <i>Ceratium</i> ont été renommées dans les genres <i>Neoceratium</i> ou <i>tripos</i>	Ne plus utiliser le taxon virtuel : " <i>Ceratium</i> + <i>Neoceratium</i> " qui ne comprend pas le genre <i>Tripos</i> . Saisir sur la famille Ceratiaceae
<i>Diplopsalis</i> , <i>Diplopelta</i> , <i>Diplopsalopsis</i> , <i>Preperidinium</i> , <i>Oblea</i>		Ce taxon virtuel " <i>Diplopsalis</i> + <i>Diplopelta</i> + <i>Diplopsalopsis</i> + <i>Preperidinium</i> + <i>Oblea</i> " a été créé en raison de la difficulté à différencier ces genres



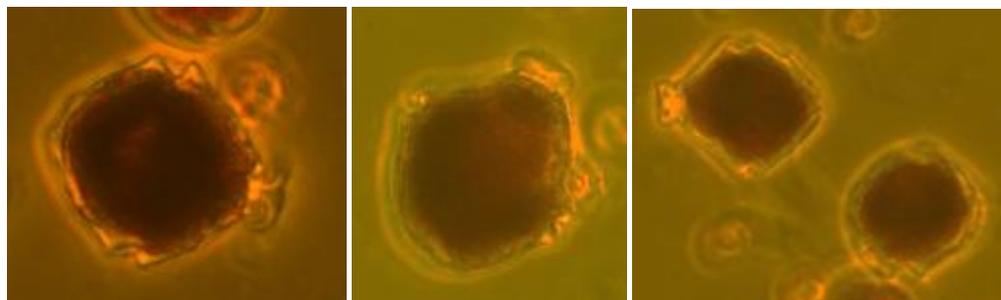
Taxons douteux (tri alphabétique)	Difficultés pour l'identification	Choix à appliquer (saisie dans Q <sup>2</sup> )
<i>Ditylum brightwellii</i>	Trois espèces référencées dans le WoRMS. Il semble que <i>Ditylum brightwellii</i> soit la seule identifiée dans nos eaux	Saisir sur l'espèce <i>Ditylum brightwellii</i> . Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être corrigées dans la base
<i>Gonyaulax spinifera</i>	Plusieurs espèces possèdent la même morphologie au niveau des cellules végétatives. Il s'agit donc d'un complexe d'espèces	Les données saisies dans Q <sup>2</sup> sur ce taxon sont considérées comme celles du complexe <i>G. spinifera</i>
<i>Gyrodinium spirale</i>	Plusieurs espèces possèdent la même morphologie. Il s'agit donc d'un complexe d'espèces	Les données saisies dans Q <sup>2</sup> sur ce taxon sont considérées comme celles du complexe <i>Gyrodinium spirale</i>
<i>Heterocapsa niei</i> ou <i>Heterocapsa</i> sp.	A part <i>H. triquetra</i> que l'on peut distinguer par sa pointe antapicale les autres espèces du genre sont difficiles à identifier. En outre, certaines d'entre elles peuvent être confondues avec des espèces du genre <i>Azadinium</i>	Hormis <i>Heterocapsa triquetra</i> , saisir sur le genre <i>Heterocapsa</i> sachant qu'il peut y avoir suspicion d' <i>Azadinium</i>
<i>Katodinium</i> / <i>Amphidinium</i>	Pour certaines espèces l'observation de la nage sur le vivant est nécessaire afin de savoir si le cingulum est très antérieur (cas d' <i>Amphidinium</i> ) ou très postérieur (cas de <i>Katodinium</i> )	Si la distinction n'a pas pu être réalisée on peut saisir au niveau supérieur soit : Famille Gymnodiniaceae. Toutefois cette famille est large et comprend aussi des genres comme <i>Akashiwo</i> , <i>Cochlodinium</i> , <i>Gymnodinium</i> , <i>Gyrodinium</i> , <i>Lepidodinium</i> , <i>Torodinium</i> etc. Ou, saisir sur le taxon virtuel : <i>Amphidinium</i> + <i>Katodinium</i>
<i>Lauderia annula</i> ou <i>Lauderia</i> sp.	Les taxons <i>Lauderia</i> ( <i>Thalassiosirale</i> ) et <i>Schroederella</i> ( <i>Melosirale</i> ) ne sont pas distinguables	Saisir sur le taxon virtuel : <i>Lauderia</i> + <i>Schroederella</i>
<i>Leptocylindrus</i>	L'identification au niveau de l'espèce est douteuse	On peut distinguer les formes de type <i>L. minimus</i> des autres, qui sont à saisir au niveau du genre
<i>Lithodesmium undulatum</i> ou <i>Lithodesmium</i> sp.	Trois espèces sont répertoriées dans le WoRMS	Saisir sur l'espèce <i>Lithodesmium undulatum</i> . Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être corrigées dans la base



Taxons douteux (tri alphabétique)	Difficultés pour l'identification	Choix à appliquer (saisie dans Q <sup>2</sup> )
<p><i>Nitzschia longissima</i> / <i>Ceratoneis closterium</i> (ex <i>Cylindrotheca closterium</i>)</p> 	<p>La distinction de ces espèces est délicate. Certain utilisent le critère arbitraire de la taille. Extrait du WoRMS: <i>Nitzschia longissima</i> a pour basionyme et synonyme <i>Ceratoneis longissima</i> Par ailleurs : Variety  <a href="#">Nitzschia longissima var. closterium (Ehrenberg) Van Heurck, 1885</a> accepted as  <a href="#">Nitzschia closterium (Ehrenberg) W.Smith, 1853</a> accepted as  <a href="#">Cylindrotheca closterium (Ehrenberg) Reimann &amp; J.C.Lewin, 1964</a> accepted as  <a href="#">Ceratoneis closterium Ehrenberg, 1839</a></p>	<p>Saisir sur le genre <i>Ceratoneis</i> permet de distinguer ces cellules des autres <i>Nitzschia</i></p>
<p><i>Paralia sulcata</i> ou <i>Paralia</i> sp.</p>	<p>Les chaînes typiques de <i>Paralia sulcata</i> sont facilement reconnaissables</p>	<p>Saisir sur l'espèce <i>Paralia sulcata</i>. Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être corrigées dans la base</p>
<p><i>Prorocentrum cordatum</i> (ex <i>P. minimum</i>)</p>	<p>Confusion possible avec <i>P. balticum</i></p>	<p>Saisir sur le taxon virtuel <i>Prorocentrum balticum + cordatum</i></p>
<p><i>Protoperidinium</i>, <i>Peridinium</i></p>	<p>Difficulté à différencier ces genres</p>	<p>Saisir sur le taxon virtuel "<i>Protoperidinium + Peridinium</i>"</p>
<p><i>Protoperidinium steinii</i>, <i>P. pyriforme</i></p>	<p>Difficulté à différencier ces espèces</p>	<p>Saisir sur le taxon virtuel "<i>Protoperidinium steinii + pyriforme</i>"</p>
<p><i>Scrippsiella</i></p>	<p>Nombreuses confusions possibles (entre espèces et avec les genres voisins <i>Ensiculifera</i> et <i>Pentapharsodinium</i>...</p>	<p>Saisir sur le taxon virtuel <i>Scrippsiella + Ensiculifera + Pentapharsodinium + Bysmatrum</i></p>
<p><i>Skeletonema costatum</i> ou <i>Skeletonema</i> sp.</p>	<p>Plusieurs espèces possibles non distinguables facilement</p>	<p>Saisir sur le genre <i>Skeletonema</i></p>
<p><i>Thalassionema nitzschioides</i> ou <i>Thalassionema</i> sp.</p>	<p>Plusieurs espèces possibles non distinguables facilement</p>	<p>Saisir sur le genre <i>Thalassionema</i></p>

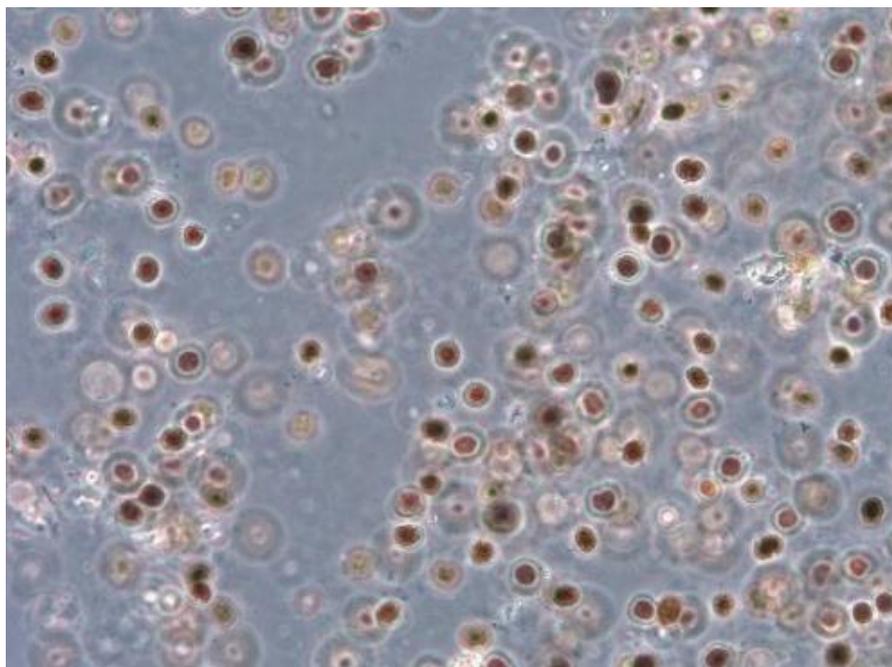
*Nouvelle espèce cible*

*Vulcanodinium rugosum*<sup>3</sup> (Etang d'Ingril 05/08/2013.) Taille des cellules 25 µm.



Les *Vulcanodinium rugosum* se retrouvent souvent en amas de kystes temporaires et pas toujours sous leur forme végétative.

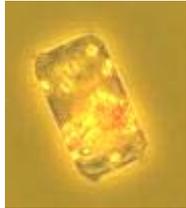
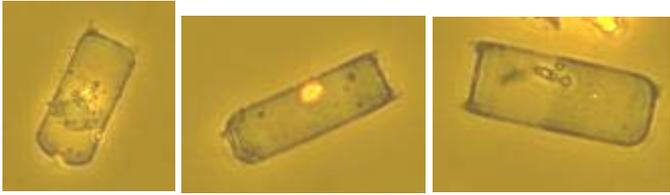
*Bloom exceptionnel de Lepidodinium chlorophorum* (cellules fixées au lugol), cas d'un échantillon nécessitant une dilution.



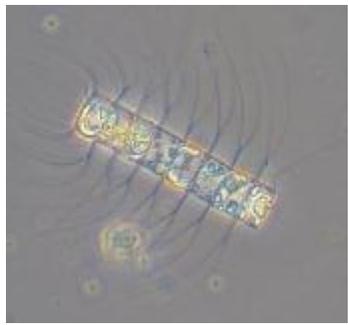
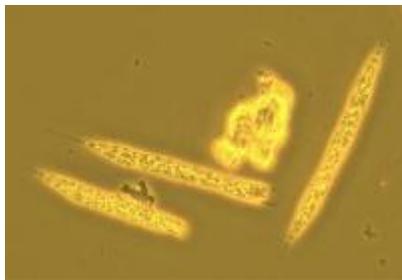
<sup>3</sup> Nézan Elisabeth, Chomérat Nicolas (2011). *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Cryptogamie Algologie*, 32(1), 3-18.



*Stades de dégénérescence des cellules*

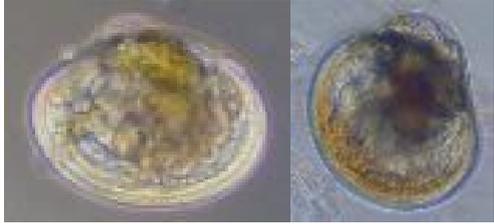
Cellules prises en compte	Cellules non comptées si la floraison de l'espèce a été détectée lors de l'échantillonnage précédent, si non il faut les compter car témoignant d'une fin de floraison.
	

*Nombre de cellules comptées dans les exemples suivant :*

	<p>Cas de cellules déformées : ici 2 cellules de <i>Pseudo-nitzschia</i> présentent des caractères morphologiques inhabituels. Dans l'image, 3 cellules sont comptées</p>
	<p>6 cellules (8 dont 2 quasiment vides)</p>
	<p>2 demi + 1 entière = 2 cellules</p>



*A ne pas dénombrer :*

 <p>TINTINNIDES (Ciliophora, Oligotrichia, Tintinnina) DE L'ATLANTIQUE BORÉALE, DE L'OCEAN INDIEN ET DE QUELQUES MERS ADJACENTES ( MEDITERRANÉE, MER CARAÏBE, MER ROUGE, Océan Indien) ET DISTRIBUTION. OBSERVATIONS BASÉES SUR LES LORICALES.</p> <p>par GUY PAULMIER</p> <p>Station IFREMER Plouzané - BP 21107 L'Herminier FRANCE</p> 	<p>Tintinnides</p>
	<p>Larves de bivalves (ici non lugolées)</p>
	<p>Grains de pollen de Gymnosperme.</p>

**ANNEXE IV. DOCUMENTS ET OUTILS D'AIDE À L'IDENTIFICATION**

## Liste non exhaustive

## DOCUMENTS

- Bérard-Therriault L., Poulin M., Bossé L., 1999.** Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du Golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires, Publ. Spéc.can. halieut.aquat.128. 387p.
- Delgado M., Fortuño J.M., 1991.** Atlas de Fitoplancton del Mar Mediterráneo, 133 p.
- Drebes G. Marines Phytoplakton, 1974.** Ed : Georg Thieme Verlag Stuttgart. ISBN 3 13 503901 3
- Hoppenrath M., Murray S.H., Chomérat N., Horiguchi T., 2014.** Marine benthic dinoflagellates – unveiling their worldwilde biodiversity. ISBN 978-3-510-61402-8
- Hoppenrath M., Elbrächter M., Drebes G., 2009.** Marine phytoplankton – Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. ISBN 978-3-510-61392-2
- Kraberg A., Baumann M., Dürselen C.D., 2010.** Coastal Phytoplankton – Photo Guide for Northern European Seas. ISBN 978-3-89937-113-0
- Lassus P., 1978.** Catalogue descriptif des principaux organismes responsables d'eaux rouges. 60 p.
- Lassus P., 1980.** Mise à jour des données sur les organismes responsables d'eaux colorées. Extension au phytoplancton produisant des toxines, 200 p.
- Lassus P., 1988.** Plancton toxique et plancton d'eaux rouges sur les côtes européennes, 111 p.
- Moestrup, Ø. (ed.): IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; ioc.unesco.org/hab/data.htm, 2004.**  
<http://www.bi.ku.dk/ioc/>
- Nézan E., Piclet G., 1996.** Guide pratique à l'usage des analystes du phytoplancton. Ce guide comprend des fiches par taxon. ISBN 2-919373-21-5
- Nézan E., 1996.** Surveillance du phytoplancton marin, (les principales classes hormis les diatomophycées). Manuel illustré adapté à la formation des analystes. Document IFREMER.
- Paulmier G., 1992.** Catalogue illustré des microphytes planctoniques et benthiques des côtes normandes. Rapport IFREMER/DRV/RH/92.007, 107 pp.
- Paulmier G., 1997.** Atlas des diatomophycées des côtes françaises et des aires océaniques adjacentes. Rapport interne IFREMER/DRV/RH/97-014, 148 pp.
- Sournia A. (ed.), 1986 – 1990. Atlas du phytoplancton marin (éditions du CNRS) :**
- **Sournia A., 1986, volume 1 :** cyanophycées, dictyochophycées, dinophycées, raphidophycées. 219 pp, 46 pl.
  - **Ricard M. 1987, volume 2 :** diatomophycées. 297 pp, 71 pl.
  - **Chrétiennot-Dinet M.J., 1990, volume 3 :** chlorarachniophycées, chlorophycées, chrysophycées, cryptophycées, euglénophycées, eustigmatophycées, prasinophycées, prymnésiohycées, rhodophycées, tribophycées. 260 p, 49 pl.

**Sournia A., Belin C., Berland B., Erard-Le Denn E., Gentien P., Grzebyk D., Marcaillou-Le Baut C., Lassus P., Partensky F., 1991.** Le phytoplancton nuisible des côtes de France : de la biologie à la prévention, 154 p.

**Trégouboff G., Rose M., 1957.** Manuel de planctonologie méditerranéenne, 2 vol.

---

*Outils numériques*

**Nézan E., Rocher G., 2003.** Les microalgues productrices de toxines. Guide illustré de présentation des micro-algues productrices de toxines à l'usage des analystes du REPHY, Document IFREMER Concarneau.

<http://w3.ifremer.fr/surveillance/rephy/dia-taxinomie.htm>

**Nézan E. & Rocher G.** Diaporama didactique sur les diatomées.

<http://w3.ifremer.fr/surveillance/rephy/dia-taxinomie.htm>

Animation interactive permettant la visualisation des caractères morphologiques du genre *Alexandrium* :

[http://envlit.ifremer.fr/documents/documents\\_pedagogiques/alexandrium\\_minutum\\_plaques](http://envlit.ifremer.fr/documents/documents_pedagogiques/alexandrium_minutum_plaques)

Animation interactive permettant de visualiser les différences morphologiques entre les populations d'*Alexandrium minutum* :

[http://envlit.ifremer.fr/documents/documents\\_pedagogiques/alexandrium\\_minutum\\_morphotypes](http://envlit.ifremer.fr/documents/documents_pedagogiques/alexandrium_minutum_morphotypes)

## ANNEXE V. MODELE EXEMPLE DE FICHE DE RESULTAT

*A imprimer sur feuille A3 recto verso*

**N° enregistrement échantillon :**

### PASSAGE

**Lieu de surveillance (libellé) :**

**Date passage :**   **Heure passage :**

**Autre information éventuelle :**

### OBSERVATIONS SUR LE VIVANT (Facultatif)

**Date, heure :**

**Visa agent observateur :**

Volume filtré	<input type="text"/>	Volume du concentrât	<input type="text"/>	Volume observé	<input type="text"/>
---------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------	----------------------

### ESPECES TOXIQUES OU DOUTEUSES

### AUTRES COMMENTAIRES







<b>DIATOMEES (suite)</b>				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				○ □

<b>DINOFLETTES (suite)</b>				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				○ □

<b>AUTRES CLASSES (suite)</b>				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				○ □

<b>VERIFICATION DES CALCULS DE RESULTATS</b>	Fait le	VISA
--	---------	------

**SAISIE DANS BANQUE DE DONNEES CENTRALISEE (QUADRIGE<sup>2</sup>)**

Date des saisies	VISA	Contrôle des saisies le	VISA



## ANNEXE VI. PRÉCISION DES COMPTAGES

Si l'on considère que les populations comptées respectent une distribution de Poisson dans la chambre de sédimentation, on peut évaluer la précision des comptages. L'intervalle de confiance (pour un niveau de signification de 95%) est calculé grâce au pourcentage de confiance suivant :

$$\% \text{ confiance} = \pm 200\% / \sqrt{n}$$

où  $n$  est le nombre de cellules comptées.

Exemple :

- on travaille avec une chambre de sédimentation de 10 mL
- 5 *Dinophysis* y ont été comptés
- ce comptage donne 500 cell/L

$$\text{le \% de confiance} = \pm 200\% / \sqrt{5} = 89,44 \%$$

les limites attendues du comptage sont : 89,44 % de 500 cell/L =  $(500/100) \times 89,44 = 447$

résultat final : nombre de cellules de *Dinophysis* par litre =  $500 \pm 447$  cell/L

Le tableau ci-dessous donne l'exemple de l'intervalle de confiance du comptage pour une lecture de cuves entières de 10 mL et de 25 mL. Cette méthode de calcul de précision peut être adaptée à tout dénombrement réalisé à partir d'une surface élémentaire de lecture (donc du volume correspondant), qu'elle soit un ou plusieurs champs oculaires, un ou plusieurs transects, une portion de cuve ou une cuve entière.

nb cell. lues	% confiance	Cuve de 10 ml			Cuve de 25 ml		
		cell/l	min cell/l	max cell/l	cell/l	min cell/l	max cell/l
1	200	100	1	300	40	1	120
2	141	200	2	483	80	2	193
3	115	300	3	646	120	3	259
4	100	400	4	800	160	4	320
5	89	500	53	947	200	21	379
6	82	600	110	1090	240	44	436
7	76	700	171	1229	280	68	492
8	71	800	234	1366	320	94	546
9	67	900	300	1500	360	120	600
10	63	1000	368	1632	400	147	653
11	60	1100	437	1763	440	175	705
12	58	1200	507	1893	480	203	757
13	55	1300	579	2021	520	232	808
14	53	1400	652	2148	560	261	859
15	52	1500	725	2275	600	290	910
16	50	1600	800	2400	640	320	960
17	49	1700	875	2525	680	350	1010
18	47	1800	951	2649	720	381	1059
19	46	1900	1028	2772	760	411	1109
20	45	2000	1106	2894	800	442	1158
25	40	2500	1500	3500	1000	600	1400
30	37	3000	1905	4095	1200	762	1638
35	34	3500	2317	4683	1400	927	1873
40	32	4000	2735	5265	1600	1094	2106
45	30	4500	3158	5842	1800	1263	2337
50	28	5000	3586	6414	2000	1434	2566
55	27	5500	4017	6983	2200	1607	2793
60	26	6000	4451	7549	2400	1780	3020
65	25	6500	4888	8112	2600	1955	3245
70	24	7000	5327	8673	2800	2131	3469
75	23	7500	5768	9232	3000	2307	3693
80	22	8000	6211	9789	3200	2484	3916
85	22	8500	6656	10344	3400	2662	4138
90	21	9000	7103	10897	3600	2841	4359
95	21	9500	7551	11449	3800	3020	4580
100	20	10000	8000	12000	4000	3200	4800
150	16	15000	12551	17449	6000	5020	6980
200	14	20000	17172	22828	8000	6869	9131
250	13	25000	21838	28162	10000	8735	11265
300	12	30000	26536	33464	12000	10614	13386
350	11	35000	31258	38742	14000	12503	15497
400	10	40000	36000	44000	16000	14400	17600
500	9	50000	45528	54472	20000	18211	21789
1000	6	100000	93675	106325	40000	37470	42530