

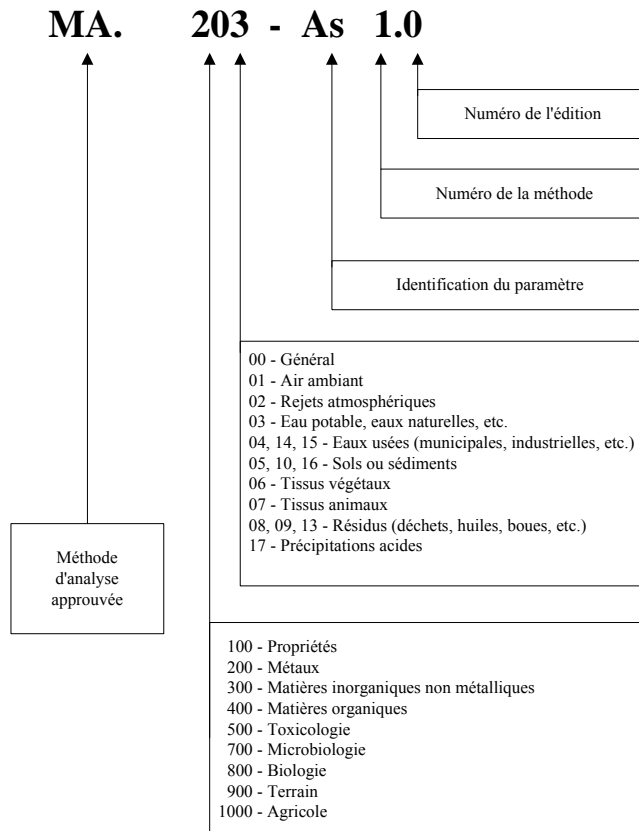
Méthode d'analyse



MA. 800 – Cya.dep 1.0

Dépistage des cyanobactéries

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.
Dépistage des cyanobactéries, MA. 800 – Cya.dep 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2012, 16 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
2700, rue Einstein, bureau E.2.220
Québec (Québec) G1P 3W8
Téléphone : 418 643-1301
Télécopieur : 418 528-1091
Courriel : ceaeq@mddep.gouv.qc.ca

© Gouvernement du Québec, 2012

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	6
3.1. Incertitude qualitative	6
3.2. Incertitude quantitative	6
3.3. Limite de détection de la méthode (LDM)	6
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	7
5. MATÉRIEL ET RÉACTIFS	8
6. PROTOCOLE ANALYTIQUE	8
6.1. Préparation des échantillons	8
6.2. Calibration des microscopes inversés	10
6.3. Observation des échantillons, identification et dénombrement	10
6.4. Acceptabilité des résultats	12
7. COMPILATION ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	13
8. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ	13
9. RÉFÉRENCES	14

INTRODUCTION

Les cyanobactéries sont des microorganismes photosynthétiques responsables d'une part de la production primaire en milieu aquatique. Chez plusieurs genres, les cellules sont regroupées en colonies ou en filaments et peuvent former des masses visibles à l'œil nu pouvant prendre des proportions imposantes. Contrairement aux algues, qui sont des eucaryotes (c'est-à-dire des cellules avec un noyau contenant le matériel génétique), les cyanobactéries, communément appelées « algues bleu-vert », sont des procaryotes (c'est-à-dire des cellules sans noyau), donc des bactéries. Elles contiennent des pigments photosynthétiques (chlorophylle *a*, phycocyanine, phycoérythrine, etc.) qui leur permettent d'utiliser le soleil comme source énergétique et de réaliser la photosynthèse. D'un point de vue fonctionnel, les cyanobactéries se rapprochent davantage des algues que des autres bactéries non photosynthétiques. L'appellation « algue bleu-vert » provient de la coloration des premières cyanobactéries identifiées. Toutefois, ces organismes peuvent présenter des variations de couleur allant du vert olive au pourpre. Les cyanobactéries, et parfois d'autres types d'algues (chlorophycées, euglènes, etc.), sont responsables de proliférations excessives que l'on nomme « fleurs d'eau » et qui peuvent recouvrir une surface importante d'un plan d'eau. Elles produisent souvent des odeurs nauséabondes et plusieurs espèces sont productrices de toxines (microcystine, anatoxine, saxitoxine, etc.).

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique aux eaux de surface incluant les eaux brutes destinées à la consommation, aux eaux souterraines et aux eaux potables traitées. Elle est utilisée dans le cadre du Plan de gestion des épisodes de fleurs d'eau de cyanobactéries du gouvernement du Québec.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Le **dépistage des cyanobactéries** consiste à identifier les trois ou quatre genres dominants de cyanobactéries (selon la densité cellulaire) et à leur attribuer une classe d'abondance en cellules/ml. De façon occasionnelle, jusqu'à 6 genres peuvent être rapportés au certificat d'analyse lorsque l'échantillon contient une communauté fortement diversifiée dans laquelle aucun genre n'est vraiment dominant. L'analyse en dépistage exclut l'identification et le dénombrement des picocyanobactéries (diamètre inférieur à 2 µm), lesquelles sont peu problématiques en termes de production de toxines. Des classes d'abondance sont attribuées pour le total des cyanobactéries à potentiel toxique, pour le total des cyanobactéries sans potentiel toxique et pour le total des cyanobactéries tous genres confondus. Il n'y a pas de détermination du biovolume ni d'identification détaillée des autres algues. Par contre, si l'échantillon contient une fleur d'eau d'un genre n'appartenant pas aux cyanobactéries, il sera identifié et noté à titre de remarque, puis grossièrement quantifié à titre indicatif.

L'étape de l'identification constitue la base de l'analyse. Bien qu'elle soit appuyée par des ouvrages de référence, elle demeure fortement liée à l'expertise de l'analyste et, par conséquent, elle peut comporter une certaine incertitude. L'application de ces analyses nécessite non seulement une connaissance approfondie des organismes constituant le plancton, mais également une expérience prolongée de l'identification des algues en microscopie. Les communautés planctoniques contiennent une multitude de groupes taxonomiques et un grand nombre de genres

et d'espèces d'algues. À elle seule, la détermination de la densité algale et du biovolume est peu utile sans une identification fiable.

3. FIABILITÉ

3.1. Incertitude qualitative

L'incertitude qualitative est liée à l'étape d'identification des cyanobactéries. Les principaux facteurs qui ont une influence sur cette incertitude sont : l'état de préservation des organismes, la disponibilité de guides d'identification appropriés, l'incertitude taxonomique liée à la révision de la classification du vivant et l'expertise de l'analyste.

3.2. Incertitude quantitative

Les principaux facteurs liés à l'incertitude du dénombrement sont : la représentativité de l'échantillon prélevé, l'erreur liée au sous-échantillonnage effectué au laboratoire, la procédure de comptage, l'estimation du nombre de cellules par colonie ou par filament, la conversion du nombre de colonies ou de filaments en densité cellulaire et le nombre total de cellules comptées. Le tableau 1 présente le degré de précision associé au dénombrement pour les algues unicellulaires distribuées aléatoirement dans la chambre de comptage. Le même principe s'applique pour les unités de compte que sont les colonies et les filaments. La formule pour calculer la précision du dénombrement pour un seuil de confiance de 95 % est la suivante :

$$\% \text{ de précision} = \frac{2}{\sqrt{\text{nombre de cellules comptées}}} \times 100$$

Tableau 1. Précision du dénombrement pour un seuil de confiance de 95 % en fonction du nombre de cellules comptées pour une distribution aléatoire d'algues unicellulaires

Nombre de cellules comptées	Précision
4	± 100 %
16	± 50 %
50	± 28 %
100	± 20 %
400	± 10 %
1600	± 5 %

3.3. Limite de détection de la méthode (LDM)

Le calcul de la densité cellulaire et de la limite de détection prennent en compte le volume d'échantillon sédimenté, le facteur de dilution ou de concentration, le volume total de la chambre d'Utermöhl, la fraction observée du volume total de la chambre d'Utermöhl et, au besoin, le nombre de chambres observées.

La limite de détection est calculée comme suit :

$$\text{LDM} = (\text{volume total/volume observé})/\text{facteur de concentration ou de dilution}$$

Par exemple : si 60 ml d'un échantillon sont sédimentés, le facteur de concentration est de 60, et si 100 µl du volume de la chambre d'Utermöhl de 2973 µl sont observés, la limite de détection est de :

$$\text{LDM} = (2973 \mu\text{l}/100 \mu\text{l})/60 = 0,5 \text{ cellule/ml ou } 1 \text{ cellule/2 ml}$$

Dans la majorité des cas de dépistage des cyanobactéries, les échantillons d'eau de surface ne sont pas concentrés car les densités cellulaires sont suffisamment élevées. La meilleure limite de détection est alors de 1 cellule/2,973 ml si toute la surface de la chambre est observée. Par contre, si la densité cellulaire est relativement élevée, la LDM sera plus élevée si le dénombrement est réalisé par visées ou par transects. La plus basse limite de détection est de 1 cellule/100 ml pour les échantillons à faible densité (eau potable traitée ou eau de surface) ayant subi une concentration à l'aide d'une chambre d'Utermöhl et d'un tube à sédimentation de 100 ml et un dénombrement de la surface entière de la chambre.

À noter que la valeur de la LDM n'a pas d'incidence déterminante dans le dépistage des cyanobactéries, car le plus bas seuil de préoccupation en termes de gestion environnementale est de 1000 cellules/ml (cas de l'eau potable traitée), ce qui est largement au-dessus des limites de détection pratique pour cette méthode.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons d'eau destinés au dépistage des cyanobactéries sont préservés directement sur le terrain à l'aide d'une solution de lugol. Des contenants en verre sont utilisés pour que le lugol ne soit pas adsorbé sur les parois (comme c'est le cas avec les contenants de plastique) et perde son efficacité. La concentration de lugol nécessaire pour bien préserver les échantillons est de 1 % V/V (ce qui correspond à une couleur près de celle du cognac). Le lugol préserve relativement bien les fines structures des cyanobactéries et il améliore leur sédimentation dans la chambre d'Utermöhl. Par contre, il colore les cellules, ce qui peut nuire à l'identification. La concentration de lugol ne doit pas dépasser 1 % V/V pour éviter une déformation des cellules et une coloration trop intense. Il est également primordial de s'assurer que les bouchons des bouteilles soient hermétiques aux gaz. Le lugol s'évapore rapidement lorsqu'il entre en contact avec l'air et la préservation des échantillons s'en trouve affectée. Le lugol est aussi très sensible à la lumière et a tendance à s'oxyder. C'est pourquoi après quelques jours ou lors d'une conservation prolongée d'un échantillon, il peut être nécessaire d'en rajouter (*cf.* 6.1). De plus, lorsque l'échantillon contient une forte densité de cellules, il faut effectuer une dilution le plus rapidement possible pour assurer une bonne préservation. Le temps de contact de l'échantillon avec le lugol doit être d'au moins 24 h avant l'analyse pour favoriser une bonne sédimentation des cyanobactéries.

Les échantillons lugolés sont conservés à la température ambiante, à l'obscurité et dans un endroit bien aéré s'ils sont analysés dans les 30 jours suivant leur prélèvement. Si les échantillons doivent être conservés sur une plus longue période avant d'être analysés ou s'ils sont conservés à des fins de connaissance, ils devraient être gardés au froid (près de 4 °C) et à

l'obscurité. Finalement, les bouteilles doivent être remplies à environ 80 % pour que le jeu d'air permette un brassage adéquat de l'échantillon.

5. MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Bouteilles de 125 ml en verre
- Solution de lugol (10 % d'iodure de potassium et 5 % de cristaux d'iode)
- Chambre d'Utermöhl (2973 µl) avec anneau de métal
- Tubes à sédimentation pour chambre d'Utermöhl (5, 10, 25, 50, 60 et 100 ml)
- Pipettes
- Silicone
- Microscopes inversés équipés d'oculaires de 15X et d'objectifs de 10, 20, 40 et 60X (ex. : Nikon Éclipse TE 2000 ou Éclipse Ti-S) et équipés pour des observations en contraste de phase ou en contraste d'interférence différentielle
- Disque Whipple et micromètre pour chaque microscope
- Lame calibrée (ou lame étalon)
- Lamelles de verre (épaisseur < 0,17 mm)
- Lamelles de verre pour recouvrir la chambre d'Utermöhl

6. PROTOCOLE ANALYTIQUE

6.1. Préparation des échantillons

Avant de procéder au sous-échantillonnage, **les échantillons doivent être acclimatés à la température ambiante et homogénéisés**. Il est important que la bouteille ne soit pas trop remplie pour permettre un bon mélange. L'homogénéisation se fait généralement à l'aide d'un brassage vigoureux, qui permet de briser les gros agrégats et qui facilite le comptage. Par contre, cette procédure peut nuire à l'identification à l'espèce des cyanobactéries. Comme l'analyse par dépistage s'arrête au genre, le brassage vigoureux est adéquat pour ce type d'analyse. Si l'analyse porte sur de l'eau de surface et qu'une seule chambre d'Utermöhl est sédimentée, le brassage de la bouteille est suivi d'un brassage par aspiration/expiration de liquide à l'aide de la pipette juste avant de prélever le sous-échantillon. L'étape du brassage est critique et pour minimiser les différences d'un sous-échantillonnage à l'autre, elle doit être appliquée systématiquement.

Les échantillons présentant une forte densité algale (fleur d'eau) doivent être acheminés rapidement au laboratoire et de préférence être conservés au froid. À leur arrivée, ces échantillons doivent être dilués et du lugol est rajouté pour assurer la conservation. Le facteur de

dilution doit être noté sur la bouteille de la dilution et sur la feuille de travail. Une forte densité d'algues absorbe rapidement le lugol et peut entraîner une dégradation des cellules si la durée de conservation est prolongée.

La préparation des chambres d'Utermöhl est également une étape critique. Une première observation rapide de l'échantillon sous lame et lamelle est parfois nécessaire pour déterminer si l'échantillon doit être dilué ou s'il peut être observé tel quel. Pour assurer un dénombrement optimal, la densité cellulaire doit permettre aux cellules libres, aux filaments et aux colonies de se sédimenter indépendamment les uns des autres, mais sans produire trop d'espaces « vides » entre les objets sédimentés. Lors de l'utilisation des chambres d'Utermöhl, **tout le matériel, incluant les échantillons, doit être à la température ambiante** du lieu où seront effectuées les observations en vue de réduire au minimum les mouvements de convection de l'échantillon dans la chambre. Ces mouvements peuvent être responsables d'une sédimentation non aléatoire et biaiser les résultats du dénombrement lorsque l'analyse s'effectue en procédant par visées ou par transects.

La chambre d'Utermöhl consiste en une lamelle épaisse en plexiglas percée d'un trou dans lequel se fixe une chambre à ouverture ronde contenant 2973 µl. Cette chambre est constituée d'un anneau de métal et d'une lamelle de verre ronde et mince se fixant sur le fond. Ces lamelles de 25 mm de diamètre ont une épaisseur de 0,13 à 0,17 mm pour la catégorie 1 et entre 0,17 et 0,25 mm pour la catégorie 2. Il est recommandé de n'utiliser que des lamelles de catégorie 1 afin d'optimiser la qualité de l'image.

Pour la majorité des échantillons sujets au dépistage des cyanobactéries, il n'y a pas de concentration et une seule chambre est remplie avec 2973 µl. Le remplissage de la chambre est une étape cruciale et il se fait à l'aide d'une pipette et d'un embout dont l'ouverture minimum est de 3 mm pour s'assurer que les taxons de grandes tailles ne soient pas exclus du sous-échantillon. **La chambre doit être remplie en totalité, doucement et d'une seule fois** en tenant la pipette à la verticale pour réduire le mouvement du liquide à l'intérieur de la chambre. Une lamelle est ensuite délicatement déposée sur la chambre en évitant de piéger des bulles d'air. L'échantillon est ensuite **sédimenté à l'obscurité pendant 2 heures** (le temps peut être plus long au besoin) pour permettre aux cyanobactéries de se déposer sur le fond de la chambre. L'enceinte de sédimentation doit permettre de réduire les pertes par évaporation et la formation de bulles d'air dans la chambre.

Certaines cyanobactéries possèdent des vacuoles gazeuses, qui peuvent nuire à leur sédimentation. Pour s'assurer qu'il ne reste pas de cellules en suspension, **il faut absolument effectuer une mise au point dans la colonne d'eau et en surface de la chambre avant le comptage**. Si plusieurs cellules s'y trouvent, il faut laisser se sédimenter plus longtemps. Différentes techniques utilisant la pression peuvent faire éclater les vacuoles, mais elles ne sont ni validées ni utilisées au CEAEQ.

La manipulation des chambres, la surface sur laquelle elles sont déposées et la position dans laquelle elles sont placées lors de la sédimentation influencent grandement la distribution des cellules sur le fond de celles-ci. Une surface non conductrice de chaleur (ex. : une plaque en acrylique ou un tapis de souris) doit être utilisée pour réduire les mouvements de convection. De plus, il est primordial que la surface de travail soit bien de niveau et que les vibrations ou les chocs soient réduits le plus possible pour permettre une distribution la plus aléatoire possible.

Sandgren et Robinson (1984) ont démontré que ces chambres de sédimentation, compte tenu de leur conception cylindrique, pouvaient entraîner un effet de bordure lors de la sédimentation. Il est donc important de considérer que la sédimentation, même lorsqu'elle est faite bien à plat, peut introduire un biais : les cellules peuvent avoir tendance à se sédimenter en plus grand nombre au pourtour de la chambre par rapport au centre. Pour contrer cet effet, il est recommandé d'effectuer l'observation à l'aide de visées aléatoires, mais en s'assurant que les deux zones (pourtour et centre) soient représentées dans le compte. Lorsque les algues se sédimentent selon des modes de distribution concentrique, l'utilisation du transect tend à surestimer les algues de la zone centrale et à sous-estimer les algues de la zone périphérique.

Les échantillons présentant des agrégats, des mégacolonies ou un aspect hétérogène à l'œil nu sont traités au cas par cas tout en procédant de façon que le sous-échantillon soit le plus représentatif possible.

Après chaque utilisation, tout le matériel (comprenant la chambre et le tube de sédimentation) est démonté, nettoyé à l'aide d'un détergent doux et d'un pinceau souple (ne pas utiliser d'éthanol avec le plexiglas), rincé à l'eau déionisée et séché. Une nouvelle lamelle de verre est ensuite fixée dans l'anneau de métal de façon à éviter la contamination des échantillons subséquents.

6.2. Calibration des microscopes inversés

Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope inversé (Nikon Éclipse TE 2000 ou Éclipse Ti-S) équipé d'oculaires 15X et d'objectifs de 10X, 20X, 40X et 60X, ce qui permet des grossissements de 150X, 300X, 600X et 900X respectivement. De façon générale, la combinaison d'un microscope inversé et d'une chambre d'Utermöhl est conçue pour l'observation à 600X ou moins.

Une calibration de chacun des microscopes utilisés est effectuée à l'aide d'une lame calibrée et d'un réticule (100 unités) inséré dans l'oculaire. Cette calibration devrait être validée à chaque début de saison. Ainsi, pour chacun des objectifs, la valeur de chaque unité d'échelle du disque de Whipple est déterminée ainsi que le volume de chaque visée et de chaque transect.

6.3. Observation des échantillons, identification et dénombrement

Les principaux ouvrages de référence sont Komárek et Anagnostidis (1998, 2005) et Findlay et Kling (1979) pour l'identification des cyanobactéries. Plusieurs autres documents, dont des bases de données disponibles sur Internet, sont aussi accessibles pour appuyer l'identification (voir références).

La technique de comptage choisie lors de l'analyse doit tenir compte de l'objectif recherché. Pour le dépistage des cyanobactéries, elle est moins systématique que pour une analyse exhaustive étant donné que les résultats sont rapportés en termes de classe d'abondance et non en cellules/ml.

En tout temps, il importe de **ne pas laisser un échantillon sur le plateau du microscope de façon prolongée**, puisque la chaleur de la source lumineuse peut entraîner un mouvement de convection dans l'échantillon et une remise en suspension des cyanobactéries sédimentées.

Avant de procéder au comptage, il est nécessaire **d'effectuer une mise au point dans la colonne d'eau et en surface de la chambre** pour vérifier si la sédimentation est adéquate. Si ce n'est pas le cas, la meilleure option est d'attendre une meilleure sédimentation avant de procéder à l'observation. Toutefois, dans un contexte de dépistage, il peut parfois être possible d'effectuer une estimation de la densité cellulaire même si les cellules ne sont pas complètement sédimentées. Par contre, cette estimation ne doit se faire que si l'analyste est en mesure de déterminer avec suffisamment de certitude la classe d'abondance du genre non complètement sédimenté.

L'observation doit s'effectuer par étape pour permettre de dénombrer les différentes organisations cellulaires (unicellulaire, filament ou colonie) et ainsi obtenir une meilleure fiabilité.

La première étape consiste à identifier et à dénombrer les espèces formant des **colonies et des filaments (objets)** à un faible grossissement (objectifs 10X ou 20X respectivement) et le dénombrement est effectué sur une surface adéquate (toute la surface de la chambre, $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ de la chambre selon le cas pour les colonies et sur $\frac{1}{4}$ de la chambre ou à l'aide de transects pour les filaments). La colonie ou le filament constitue l'unité de comptage et est désigné comme l'objet. Cette première étape d'observation à plus faible grossissement permet également de dresser une liste préliminaire des genres présents dans l'échantillon.

La stratégie de comptage doit être adaptée à la taille et à la densité des objets. S'ils sont plus ou moins uniformes en taille, une évaluation du nombre moyen de cellules par objet est effectuée à un plus fort grossissement sur environ 30 objets. Par la suite, cette moyenne est utilisée pour le dénombrement en multipliant la moyenne par le nombre requis d'objets comptés. De 50 à 100 objets permet une précision de $\pm 28\%$ à $\pm 20\%$ (voir le tableau 1) et est considéré comme adéquat. Cette moyenne peut aussi provenir d'une donnée historique pour le plan d'eau ou de la littérature si le nombre de cellules par objet est peu variable.

Dans le cas où les objets sont très variables en taille, il faut procéder autrement. Pour les filaments, les cellules doivent être comptées individuellement en procédant par visée ou par transects choisis aléatoirement. Pour les colonies, il faut estimer le nombre de cellules pour une portion d'une colonie (par ex. en faisant des paquets de 10 cellules), puis en reportant cette estimation sur l'ensemble de la colonie.

Dans le cas particulier des filaments, la longueur peut aussi être utilisée comme objet. L'objet, qui est donc une unité du réticule, peut être variable selon le grossissement utilisé. La longueur de filament est obtenue en multipliant le nombre d'objets par la longueur effective de l'objet en fonction du grossissement. La longueur de filament ainsi obtenue est ensuite rapportée en termes de nombre de cellules en utilisant la dimension individuelle des cellules. Cette dimension cellulaire peut être mesurée à plus fort grossissement ou provenir de la littérature. La longueur de filament peut être utilisée de deux façons : pour obtenir une longueur totale de filament dans le volume observé ou pour calculer une longueur moyenne par filament pour ensuite compter le nombre de filaments dans le volume observé et finalement rapporter la longueur totale de filament ainsi obtenue en nombre de cellules.

Après avoir dénombré les cellules formant des colonies et des filaments, l'identification et le dénombrement du phytoplancton unicellulaire sont effectués avec les objectifs de 20X ou 40X.

La surface observée doit être adéquate et représentative de la densité cellulaire de l'échantillon. Si la répartition des cellules est aléatoire (pas d'effet de bordure visible), les transects permettent un bon balayage de la chambre. Si ce n'est pas le cas (concentration des cellules en pourtour ou au centre de la chambre), il est alors préférable de procéder au comptage par visées, qui seront sélectionnées de façon aléatoire mais en considérant les deux zones (pourtour et centre). De plus, considérer un grand nombre de visées permettra d'augmenter la représentativité de l'observation. Un dénombrement de 50 à 100 cellules est considéré comme adéquat.

Finalement, il faut se rappeler que dans le cas du dépistage des cyanobactéries, il n'y a pas d'identification ni de dénombrement des picocyanobactéries. Il est aussi à noter que l'observation des échantillons en mode dépistage porte seulement sur les trois à quatre genres dominants. Une liste préliminaire des genres présents devrait être faite lors de la première étape d'observation (compte à faible grossissement). Le tableau 2 présente la liste des genres de cyanobactéries identifiés au CEAEQ.

Tableau 2. Liste des genres pour le dépistage des cyanobactéries

<i>Anabaena (Dolichospermum)</i>	<i>Heteroleibleinia</i>	<i>Rhabdogloea</i>
<i>Anabaenopsis</i>	<i>Jaaginema</i>	<i>Rivularia</i>
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Komvophoron</i>	<i>Romeria</i>
<i>Aphanocapsa</i>	<i>Leibleinia</i>	<i>Schizothrix</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Scytonema</i>
<i>Arthrospira</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Snowella</i>
<i>Borzia</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Chroococcus</i>	<i>Merismopedia</i>	<i>Stigonema</i>
<i>Coelomoron</i>	<i>Microcrocis</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Coelosphaerium</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Trichodesmium</i>
<i>Cuspidothrix</i>	<i>Nodularia</i>	<i>Tychonema</i>
<i>Cyanodictyon</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Wollea</i>
<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Woronichinia</i>
<i>Dactylococcopsis</i>	<i>Phormidium</i>	
<i>Fischerella</i>	<i>Planktolyngbya</i>	
<i>Geitlerinema</i>	<i>Planktothrix</i>	
<i>Glaucospira</i>	<i>Plectonema</i>	
<i>Gloeocapsa</i>	<i>Pseudanabaena</i>	
<i>Gloeothece</i>	<i>Radiocystis</i>	
<i>Gloeotrichia</i>	<i>Raphidiopsis</i>	
<i>Gomphosphaeria</i>	<i>Rhabdoderma</i>	

6.4. Acceptabilité des résultats

L'acceptabilité des résultats est liée au degré de certitude de l'identification. Ce dernier est rapporté dans l'expression du résultat tel que précisé à la section 7.

7. COMPILATION ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats du dépistage des cyanobactéries sont transmis sous la forme de classes d'abondance exprimées en cellules/ml pour chacun des genres observés. Lorsque la densité d'un genre se situe à la limite entre 2 classes d'abondance, la classe supérieure est choisie par principe de précaution en appliquant une règle à deux chiffres significatifs. Par exemple, si la densité calculée est de 49 680 cellules/ml, il faut arrondir à 50 000 et basculer dans la classe d'abondance supérieure. Chaque genre ainsi que le total des cellules à potentiel toxique, le total des cellules sans potentiel toxique et le grand total se voient attribuer une classe d'abondance parmi les suivantes :

< 1	20 000 - 50 000
1 - 1000	50 000 - 100 000
1000 - 2000	100 000 - 500 000
2000 - 5000	500 000 - 2 000 000
5000 - 10 000	> 2 000 000
10 000 - 20 000	

8. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Dans le but de déterminer la variabilité et d'assurer la meilleure répétabilité possible, autant pour les dénombrements que l'identification des genres, des échantillons de contrôle devraient être analysés par tous les analystes au moins une fois par année. De plus, un contrôle de qualité doit être fait lorsque des changements importants sont apportés à la méthode ainsi que pour valider la qualification des nouveaux analystes.

Il est suggéré d'utiliser deux échantillons fantômes de densité cellulaire faible (de 10 000 à 30 000 cellules/ml) et élevée (> 250 000 cellules/ml). Ces échantillons doivent contenir au moins une espèce de petite taille qui se sédimentera lentement et une espèce de grande taille qui se sédimentera plus rapidement. Il faut aussi que des espèces coloniales, filamenteuses et unicellulaires soient présentes dans les échantillons. Chacun des analystes procède de façon individuelle à l'analyse selon le paramètre demandé.

L'observation des échantillons de contrôle devrait se faire en deux étapes. Dans un premier temps, les analystes procèdent à l'observation de la même lame (sans variation liée au sous-échantillonnage). Les analystes observent à tour de rôle le même échantillon, autant que possible avec le même microscope pour éviter de bouger l'échantillon, et dans un intervalle de temps ne dépassant pas une demi-journée. Il est fortement recommandé que le premier analyste ayant fait l'observation refasse l'observation après tous ses collègues pour valider que l'échantillon est demeuré stable tout au long de la procédure. Par la suite, chaque analyste effectue sa propre sédimentation et observe une seconde fois l'échantillon de contrôle (vérification de la variation entre les sous-échantillons).

Dans le cas où des différences significatives seraient observées (genres dominants différents, plus de 30 % d'écart entre les dénombrements ou des différences dans les identifications à l'espèce), les analystes devraient effectuer une concertation entre eux et avec le professionnel par rapport aux différences observées et, selon le cas, reprendre un nouvel échantillon de contrôle dans les jours suivants.

9. RÉFÉRENCES

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

Agence française de sécurité sanitaire des aliments et Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. *Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives*, 2006.

ANTONIADES, D., P.B. HAMILTON, M.S.V. DOUGLAS and J.P. SMOL. *Diatoms of North America: The freshwater floras of Prince Patrick, Ellef Ringnes and northern Ellesmere Island from the Canadian Arctic Archipelago*, A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2008, 649 p.

American Water Works Association. *Algae: Source to treatment. Manual of water supply practices M57, 1st edition*, Denver, 2010.

BLAIS, S. *Guide d'identification des fleurs d'eau de cyanobactéries. Comment les distinguer des végétaux observés dans nos lacs et nos rivières*, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2006, 52 p.

BOURELLY, P. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique, Tome I : Les algues vertes*, Paris, Éditions N. Boubée et Cie, 1966.

BOURELLY, P. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique, Tome II : Les algues jaunes et brunes*, Paris, Éditions N. Boubée et Cie, 1968.

BOURELLY, P. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique, Tome III : Les algues bleues et rouges*, Paris, Éditions N. Boubée et Cie, 1970.

CHORUS, I. and J. BARTRAM (ed.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*, London, E & FN Spon., 1999.

CRONBERG, G. and H. ANNADOTTER. *Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology*, International Society for the Study of Harmful Algae.

DVOŘÁK, P. and P. HAŠLER. "Occurrence and morphological variability of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyta, Nostocales) near Olomouc in 2006", *Fottea*, vol. 7, no. 1, 2007, p. 39-42.

FALLU, M.-A., N. ALLAIRE and R. PIENITZ. *Freshwater diatoms from northern Québec and Labrador (Canada). Species-environment relationships in lakes of boreal forest, forest-tundra and tundra regions*, Gebrüder Borntraeger, 2000, 200 p.

FINDLAY, D.L. and H.J. KLING. *A species list and pictorial reference to the phytoplankton of central and northern Canada – Part I and part II*, Winnipeg, Department of fisheries and the environment, Manuscript report No. 1503, 1979.

GERMAIN, H. *Flore des diatomées, eaux douces et saumâtre*, Paris, Société nouvelle des éditions Boubée, 1981.

HAŠLER, P. and A. POULÍČKOVÁ. “Planktic cyanobacteria of the central and northern Moravia”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 2, 2002, p. 25-32.

HAŠLER, P. and A. POULÍČKOVÁ. “Cyanobacteria of the West Carpathian Mts spring fens: single samplings”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 5, 2005, p. 43-45.

HAŠLER, P., A. POULÍČKOVÁ and M. LYSÁKOVÁ. “The survival and vitality of cyanobacteria and algae in fishpond bottom sediments”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 4, 2004, p. 133-134.

HUISMAN, J., H.C.J. MATTHIJS and P.M. VISSER (ed.). *Harmful cyanobacteria*, Aquatic Ecology Series, Springer, 2005.

KOMÁREK, J. “Review of the cyanoprokaryotic genus *Romeria*”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 1, 2001, p. 5-19.

KOMÁREK, J. “Phenotype diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 5, 2005, p. 1-35.

KOMÁREK, J. “The cyanobacterial genus *Macrospermum*”, *Fottea*, vol. 8, no. 1, 2008, p. 79-86.

KOMÁREK, J. and K. ANAGNOSTIDIS. *Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 – Nostocales*, Archiv. f. Hydrobiologie, Suppl-Bd, 82, 1989, 345 p.

KOMÁREK, J. and K. ANAGNOSTIDIS. *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota. Part 1: Chroococcales*, Spektrum Akademischer Verlag, 19/1, 1998, 548 p.

KOMÁREK, J. and K. ANAGNOSTIDIS. *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota. Part 2: Oscillatoriales*, Spektrum Akademischer Verlag, 19/2, 2005, 759 p.

KOMÁREK J. and T. HAUER. *CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication*, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>, 12 septembre 2011.

KOMÁREK J. and J. KOMÁRKOVÁ. “Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 2, 2002, p. 1-24.

KOMÁREK J. and J. KOMÁRKOVÁ. “Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 4, 2004, p. 1-18.

KOMÁREK J. and J. KOMÁRKOVÁ. “Diversity of Aphanizomenon-like cyanobacteria”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 6, 2006, p. 1-32.

KOMÁREK J. and E. ZAPOMĚLOVÁ. “Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 1. part : coiled types”, *Fottea*, vol. 7, no. 1, 2007, p. 1-31.

KOMÁREK J. and E. ZAPOMĚLOVÁ. “Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 2. part : straight types”, *Fottea*, vol. 8, no.1, 2008, p. 1-14.

KOMÁRKOVÁ, J. and J. NEDOMA. “The CYATAXO database”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 6, 2006, p. 49-54.

LAVOIE, I., I. LAURION et W.F. VINCENT. *Les fleurs d'eau de cyanobactéries, revue de littérature*, INRS rapport no. 916, 2007, 120 p.

LEE, R.E. *Phycology*, Cambridge University Press, 1980.

LUND, H.C. and W.G. LUND. *Freshwater algae; their microscopic world explored*, Bristol, England, Biopress Ltd., 1995.

Office national de l'eau potable. *Les algues dans les retenues de barrage utilisées pour la production d'eau potable au Maroc*.

SANDGREN, C.D. and J.V. ROBINSON. *A stratified sampling approach to compensating for non-random sedimentation of phytoplankton cells in inverted microscope settling chambers*, *European Journal of Phycology*, no. 19, 1984, p. 67-72.

SMITH, G.M. *The fresh-water algae of the United States*, 2nd edition, McGraw-Hill Book Company, 1950.

UNIVERSITY OF DURHAM, ENVIRONMENT AGENCY and LUCID. *Blue-Green Algae of the British Isles, version 2.1*, clé d'identification des cyanobactéries sur CDRom.

UNIVERSITY OF DURHAM, ENVIRONMENT AGENCY, LUCID and THE NATIONAL HISTORY MUSEUM. *Green Algae of the British Isles*, clé d'identification des algues vertes sur CDRom.

WACKLIN, P., L. HOFFMANN and J. KOMÁREK. “Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* comb. nova”, *Fottea*, vol. 9, no. 1, 2009, p. 59-64.

WEHR, D.J. and R.G. SHEATH (ed.). *Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification*, Aquatic Ecology Series, Academic Press, 2003.

WETZEL, R.G. *Limnological analysis*, 3rd edition, Springer, 2000.

ZAPOMĚLOVÁ, E. “Current taxonomic issues with planktonic representatives of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria) with special reference to their morphological features; literary review”, *Fottea* (originally Czech Phycology), vol. 6, 2006, p. 33-47.

ZICHA, O. (ed.). (1999-2011) BioLib, <http://www.biolib.cz/en>.

(1995-2011) Protist Information Server Databases, <http://protist.i.hosei.ac.jp>.