



Protocole standardisé d'échantillonnage et de conservation du phytoplancton en grands cours d'eau applicable aux réseaux de mesure DCE

Document du Groupe de Travail DCE-ESC
Version 2

Décembre 2010

**Christophe Laplace-Treyture, Christian Chauvin,
Maud Menay, Alain Dutartre,
Cemagref**

**Unité de Recherche Réseaux, Epuration et
Qualité des Eaux**

50, avenue de Verdun
F-33612 Cestas cedex

**Laura Moreau
DREAL Lorraine**

**Pôle Connaissance des Eaux Superficielles - Laboratoire
d'Hydrobiologie**

2, rue Augustin Fresnel – BP 95038

F- 57071 METZ CEDEX 03

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>3</u>
<u>PRINCIPE METHODOLOGIQUE DU PROTOCOLE.....</u>	<u>3</u>
<u>1 PERIODES ET CAMPAGNES DE PRELEVEMENT.....</u>	<u>4</u>
<u>2 POINT DE PRELEVEMENT.....</u>	<u>4</u>
<u>3 PRELEVEMENTS ET PARAMETRES MESURES.....</u>	<u>5</u>
3.1 PRELEVEMENT.....	5
3.2 ECHANTILLON POUR L'ANALYSE DU PHYTOPLANCTON	6
3.2.1 CONDITIONNEMENT DE L'ECHANTILLON PHYTOPLANCTONIQUE	6
3.2.2 FIXATION DE L'ECHANTILLON PHYTOPLANCTONIQUE.....	6
3.3 ECHANTILLON POUR LA MESURE DE CHLOROPHYLLE-A.....	7
3.4 MESURES ENVIRONNEMENTALES COMPLEMENTAIRES A L'ECHANTILLONNAGE DE PHYTOPLANCTON	8
<u>4 SAISIE DES DONNEES</u>	<u>9</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>10</u>
<u>ANNEXES.....</u>	<u>11</u>

Introduction

Ce document vise à proposer un cadre pour l'échantillonnage et la conservation des communautés phytoplanctoniques en **grands cours d'eau et canaux** dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE). Il propose aussi un cadre d'acquisition des éléments physico-chimiques qu'il serait nécessaire d'y associer.

Le domaine d'application proposé pour ce protocole s'étend à **l'ensemble des grands cours d'eau français ainsi que les canaux pour lesquels l'étude du phytoplancton est pertinente.**

Une uniformisation de la collecte des données est indispensable afin d'assurer la bancarisation et le traitement des informations sur le phytoplancton dans le cadre de la mise en œuvre de la DCE sur les cours d'eau et la mise en place des Réseaux de Surveillance (RCS, RCO) et de Référence (RR). L'objectif premier est d'obtenir une base de données cohérente à l'échelon national contenant des données comparables pour ensuite être en mesure de développer un indice planctonique comparable à l'IPLAC (Indice Planctonique LACustre) sur les cours d'eau français.

Ce travail est le fruit de la collaboration entre l'unité de Recherche Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux du Cemagref de Bordeaux et la DREAL Lorraine.

Principe méthodologique du protocole

Ce protocole a été élaboré dans le contexte de l'harmonisation des méthodes d'échantillonnage du phytoplancton en cours d'eau, mais il doit également permettre d'obtenir les données indispensables à la mise au point d'un indice national basé sur cet élément biologique en grands cours d'eau. Pour cette raison, il est indispensable, au moins dans un premier temps, de disposer dans le même temps d'analyses des peuplements phytoplanctoniques et des teneurs en chlorophylles associées. La chlorophylle est en effet le paramètre d'estimation de la biomasse, qui a été inter-étalonné en plans d'eau et qui est susceptible de l'être en grands cours d'eau pour l'élément "phytoplancton".

Ce protocole prévoit donc un échantillonnage conjoint du *phytoplancton* (techniques d'analyses biologiques) et de la *chlorophylle* (techniques d'analyses chimiques), ce qui implique de mettre en œuvre au mieux les compétences adaptées à ces deux types d'approche.

1 PERIODES ET CAMPAGNES DE PRELEVEMENT

Le choix des périodes de prélèvement est le premier élément crucial dans l'analyse des communautés phytoplanctoniques. Leur mauvais positionnement dans l'année entraîne des biais (manque de certains cortèges algaux) dans l'interprétation des données collectées.

Ainsi, les opérations de contrôle (campagnes de prélèvements) doivent couvrir la période dite estivale, soit, être réparties *a minima* de **mai à octobre**, et à raison d'une opération par mois : soit **6 opérations de contrôle par an**.

En tout état de causes, **un minimum de 4 opérations de contrôle** (voir arrêté « surveillance » du 25 janvier 2010) doit être fait sur cette même période. Elles seront alors positionnées afin de couvrir l'ensemble de la période.

Un intervalle de **2 semaines minimum** doit être respecté entre chaque opération de contrôle afin de bien couvrir l'ensemble de la période de végétation et de ne pas disposer de prélèvements trop rapprochés. Toutes les opérations de contrôle doivent être effectuées au cours du **même cycle annuel** pour ne pas fausser l'homogénéité et la représentativité des données collectées.

Dans le cas où ces consignes ne peuvent pas être respectées, en raison d'imprévus constatés en cours d'échantillonnage, la date de l'opération de contrôle posant problème doit être clairement mentionnée afin qu'elle soit facilement identifiée comme telle. En cas de **forte hydrologie**, l'opération de contrôle ne doit pas être réalisée mais doit être reportée à une date ultérieure. Dans ce cas un report minimum d'une semaine est préconisé.

Pour chaque opération de contrôle, une fiche générale « opération de contrôle », donnant les principaux éléments signalétiques généraux de la campagne (nom du cours d'eau, de la station, identité des préleveurs, dates/heures, conditions météorologiques, le cas échéant variations hydrologiques susceptibles d'influer sur les mesures et échantillonnages, bloom algal, points particuliers à signaler, nature des échantillonnages réalisés ...) doit être remplie. [Voir document informatif type en Annexe 1.](#)

2 POINT DE PRELEVEMENT

Un seul point de prélèvement est requis, **localisé à la station de mesure** ou à proximité. Il est matérialisé par un prélèvement en un point unique du cours d'eau, **dans la veine de courant principal** (Autreaux-Noppe, 2000). Le prélèvement **depuis un pont sera privilégié** dans la mesure du possible car cela permet d'accéder plus aisément aux veines de courant. En l'absence de pont, la station sera échantillonnée depuis **une embarcation** ou tout autre moyen permettant d'atteindre le courant principal.

Une carte topographique au 1/25 000^{ème} peut faciliter le repérage de la station et du point de prélèvement.

Une fois fixée, la position de ce point de prélèvement doit être relevée (de préférence à l'aide d'un récepteur GPS, dans le système de coordonnées réglementairement en vigueur) afin de pouvoir être suivie dans l'historique des données et retrouvée à chaque opération de contrôle. Un document reprenant le descriptif de ce point de contrôle (voir en [Annexe 2](#) un exemple de fiche descriptive) peut être élaboré.

3 PRELEVEMENTS ET PARAMETRES MESURES

3.1 Prélèvement

Comme annoncé dans le paragraphe précédent, un **prélèvement en un point unique** doit être réalisé sur le point de prélèvement, lors de chaque opération de contrôle.

Il s'agit de **prélever environ deux litres** d'eau au moyen d'une **bouteille à prélèvement** à clapet ou à messenger dans **le premier mètre de la colonne d'eau** en s'affranchissant des particules flottant en surface. Cette technique s'applique aussi au prélèvement depuis une embarcation.

Cas particuliers :

Dans l'impossibilité d'accéder à la station depuis un pont ou à l'aide d'une embarcation, le prélèvement peut être réalisé en dernier ressort:

- depuis le bord, dans la veine principale de courant, à l'aide d'une perche.

Dans ce cas le prélèvement doit faire l'objet d'une vigilance particulière afin d'éviter de racler les rives et de prélever dans les zones de végétation de bordure tout en évitant les particules flottant en surface.

- en amont d'un radier, praticable à pieds, dans le cas de cours d'eau présentant un radier guéable situé à l'aval de la zone plus lente et profonde à échantillonner.

Dans ce cas il faudra s'attacher à prélever dans une zone présentant environ 1 mètre d'eau, dans la zone la plus en amont possible du radier, pour ne pas racler le fond (périphyton), en évitant les zones de végétation et les particules flottant en surface.

Dans tous les cas le site d'échantillonnage sera situé à une distance suffisante de la berge pour s'affranchir des contaminations par les algues périphytiques et par les efflorescences accumulées sur les berges par le courant et les vents.

Avant utilisation, il faut s'assurer que le matériel de prélèvement est « propre ». Pour cela, nettoyer et rincer la bouteille de prélèvement et le flaconnage avec de l'eau du cours d'eau.

Une fois le prélèvement réalisé, il est impératif de bien veiller à ne pas le conserver sous une insolation ou une pluie directe pouvant modifier la qualité de l'échantillon.

3.2 Echantillon pour l'analyse du phytoplancton

3.2.1 Conditionnement de l'échantillon phytoplanctonique

Une aliquote de l'échantillon contenu dans la bouteille de prélèvement est récupérée, immédiatement après une homogénéisation du contenu de la bouteille. Elle est conservée dans un flacon à large col en **verre ou en polypropylène** (PP) transparent et propre d'une contenance de **500 ml** pour analyse du phytoplancton. Le polyéthylène (PE) est déconseillé car il absorbe l'iode contenu dans le fixatif employé (Lugol). Les flacons colorés sont à éviter car ils masquent la couleur de la fixation au Lugol. Le remplissage du flacon ne doit pas se faire jusqu'en haut pour permettre une bonne homogénéisation de l'échantillon avant la prise de sous-échantillon pour comptage en laboratoire.

Une fiche « mesures et échantillonnages » spécifique à chaque opération de contrôle (station/date) permettra de récapituler le détail de l'échantillonnage, ainsi que la nomenclature utilisée pour identifier l'échantillon et de consigner les résultats des mesures physico-chimiques réalisées sur le terrain ; [voir document informatif type en Annexe 1](#).

Suggestion / Conseil

En complément de cet échantillonnage, il est possible de faire un prélèvement au filet (30 µm de maille) au point de prélèvement afin de disposer de suffisamment de matériel pour faciliter certaines identifications taxinomiques. Le concentré est récupéré dans un flacon et fixé au lugol, au glutaraldéhyde ou au formol (voir paragraphe 3.2.2 pour les concentrations). Il s'agit là, d'apporter une vision complémentaire de la diversité des espèces présentes (approche qualitative).

3.2.2 Fixation de l'échantillon phytoplanctonique

L'échantillon de phytoplancton est fixé sur le **terrain** à l'aide d'une solution de Lugol alcalin du commerce ou préparée (voir détail en [Annexe 3](#)) afin d'obtenir une concentration finale d'environ 0,5 % dans l'échantillon, soit **environ 8 gouttes pour 100 ml** (ou 2,5 ml pour un flacon de 500 ml). Cette concentration finale peut s'apprécier à la couleur brun clair, orangée (whisky) que doit avoir l'échantillon. En fonction du type de milieu (acidité de l'eau par exemple), la couleur orangée peut être obtenue avec un nombre nettement supérieur de gouttes.

Une décoloration peut se produire avec le temps et/ou la lumière. Dans ce cas, on rajoutera quelques gouttes de Lugol pour maintenir la fixation de l'échantillon. Le volume de conservateur ajouté doit être noté car il participe au volume final de l'échantillon. L'échantillon ainsi fixé peut être conservé au maximum **3 semaines** à l'obscurité avant analyse ou 12 mois s'il est maintenu au froid et à l'obscurité entre 1 et 4 °C.

Pour une conservation de plus **longue durée** une fixation complémentaire s'impose : glutaraldéhyde ou formol. Ce dernier présente l'inconvénient de décolorer les cellules et d'entraîner la perte des flagelles de cellules fragiles avec le temps.

L'utilisation du **glutaraldéhyde** est préférable : elle se fait à une concentration finale dans l'échantillon de 0,5 %. L'utilisation du **formol** doit se faire à une concentration finale de 5 % dans l'échantillon. Voir détail des préparations des solutions mères en [Annexe 3](#).



Ces deux produits sont à manipuler avec précaution car dangereux pour la santé et l'environnement : Le **formol** est toxique par inhalation, par ingestion et par contact avec la peau. Il est classé depuis 2004 dans les substances cancérogènes (toxique de catégorie C). Et le **glutaraldéhyde** est toxique par inhalation et par ingestion et provoque des brûlures.

L'analyse ultérieure du phytoplancton en laboratoire se fait conformément aux recommandations de la norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée - norme (NF EN 15204, 2006), de décembre 2006 - correspondant à la méthode d'Utermöhl (1958) adoptée au niveau européen et suivant les spécifications particulières décrites au chapitre 5 du protocole standard d'étude du phytoplancton en plan d'eau (Laplace-Tretyure et al., 2009).

3.3 Echantillon pour la mesure de chlorophylle-a

Une deuxième aliquote de l'échantillon contenu dans la bouteille de prélèvement est récupérée, après une homogénéisation du contenu de la bouteille, pour analyse des pigments chlorophylliens au laboratoire. **Un litre d'eau** stocké dans un flacon propre en polyéthylène (PE) est en général nécessaire et suffisant quel que soit le niveau de trophie du cours d'eau.



Dans le cas où cet échantillon ne peut être réalisé sur le prélèvement fait à la bouteille à prélèvement, l'échantillon devra être réalisé sur **un autre prélèvement fait le même jour** afin de permettre son utilisation avec l'échantillon de phytoplancton.

Lorsque cela est possible, il est conseillé de procéder à la filtration de l'échantillon sur le terrain, afin de garantir la conservation des pigments avant l'analyse. Voir le protocole de filtration et de conditionnement détaillé en Annexe 4.



Dans tous les cas, la filtration devra être réalisée dans un délai de 24 heures après le prélèvement.

A défaut d'une filtration sur le terrain, l'échantillon pour analyse de la chlorophylle est stocké dans un flacon stérile, à usage unique, et conservé à l'abri de la lumière dans une glacière à environ 4°C jusqu'au transfert au laboratoire d'analyse.

3.4 Mesures environnementales complémentaires à l'échantillonnage de phytoplancton

A la différence d'autres éléments biologiques en cours d'eau, le peuplement de phytoplancton est étroitement lié au volume d'eau dans lequel il se développe, et avec lequel il se déplace. Pour l'exploitation des résultats de l'analyse biologique sur cet élément et sa mise en relation avec les paramètres de qualité physico-chimique de la masse d'eau, il est donc nécessaire de disposer de données mesurées sur le même volume d'eau.

Il est par conséquent **conseillé que l'échantillonnage du phytoplancton soit accompagné des mesures physico-chimiques** nécessaires, ou au minimum que l'échantillonnage du phytoplancton et celui de la masse d'eau pour analyses physico-chimique soient réalisés de façon concomitante (même journée).

Les mesures de physico-chimie de terrain complémentaires à l'analyse du phytoplancton comprennent lors de chaque opération de contrôle :

- la **transparence**, évaluée au moyen du disque de Secchi (EN ISO 7027, 2000) ; elle sera mesurée dans la zone la plus profonde du cours d'eau et/ou la veine de courant principale ;
- **des mesures physico-chimiques**, la température, le pH, la conductivité et l'oxygène dissous (mg/l et %). Ces paramètres pourront être mesurés sur l'aliquote destinée à l'analyse de la chlorophylle qui aura été préalablement homogénéisée (avec les sondes physico-chimiques par exemple).

L'ensemble des données sera consigné sur un document type identique pour chaque point de prélèvement de cours d'eau; [voir document informatif type en Annexe 1](#).

4 SAISIE DES DONNEES

Afin de permettre l'utilisation ultérieure des données acquises sur le compartiment phytoplanctonique des cours d'eau, la saisie des données brutes minimales doit être réalisée **sous forme informatique** et comporter les éléments suivants :

- un tableau ou document reprenant les **données générales de la station de mesure d'un cours d'eau et du point de contrôle** (caractéristiques, localisation GPS,...) – *Annexe 2* ;
- un document reprenant le détail **des opérations de contrôle** avec le nom du cours d'eau, nom de la station, les dates, les conditions météorologiques observées, le nombre et le type de paramètres mesurés et d'échantillons prélevés - *Annexe 1* ;
- le cas échéant, un tableau récapitulatif des **valeurs de physico-chimie par campagne** : transparence au disque de Secchi, température, pH, conductivité, oxygène dissous, avec les heures de mesures - *Annexe 1* ;
- un tableau contenant le **résultat de l'observation** (nom de l'opérateur, date,...) **et du comptage phytoplanctonique** : codes Sandre des taxons, codes 6 lettres des taxons, noms des taxons avec leurs noms d'auteurs, nombres de cellules comptées ainsi que les biovolumes des taxons identifiés. L'utilisation de l'outil de comptage PHYTOBS est vivement conseillée pour ce rendu (cf. Laplace-Treytore et al., 2009, logiciel mis à disposition sur le site internet dédié <https://www.hydrobio-dce.cemagref.fr>).

N.B. : L'échantillon de phytoplancton doit être conservé pour une durée **minimale de 2 ans** afin de permettre d'éventuelles vérifications d'identifications. Si sa fixation a été faite dans un premier temps par du Lugol une deuxième fixation au glutaraldéhyde ou au formol est impérative pour permettre la conservation pendant 2 ans. Pour faciliter ces vérifications, des photographies des différents taxons rencontrés dans l'échantillon peuvent être prises.

BIBLIOGRAPHIE

Autreaux-Noppe K., 2000. Contribution méthodologique à la mise en place d'un réseau de surveillance des peuplements phytoplanctoniques des eaux courantes. Rapport de thèse Université des Sciences et Technologies de Lille – UFR de Biologie. 147 p + annexes.

Arrêté « programme de surveillance » du 25 janvier 2010. Document établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement. Direction de l'eau, Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer, en charge des technologies vertes et des négociations sur le climat, 33 p.

Circulaire « surveillance » DCE 2006/16, 13 juillet 2006. Document de cadrage pour la constitution et la mise en œuvre du programme de surveillance (contrôle de surveillance, contrôles opérationnels, contrôles d'enquête et contrôles additionnels) pour les eaux douces de surface (cours d'eau, canaux et plans d'eau). Direction de l'eau, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, 39 p.

Laplace-Treytore C., Barbe J., Dutartre A., Druart J.C., Rimet F., Anneville O., 2009. Protocole standardisé d'échantillonnage, de conservation, d'observation et de dénombrement du phytoplancton en plan d'eau pour la mise en œuvre de la DCE – version 3.3.1. *Cemagref*, Groupement de Bordeaux, Unité de Recherche Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux. Rapport, 44 p.

NF EN ISO 7027, mars 2000. *Qualité de l'eau*, Détermination de la turbidité, AFNOR. 25 p.

NF EN 15204, décembre 2006. *Qualité de l'eau*, Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl), AFNOR. 39 p.

NF T 90-117, décembre 1999. *Qualité de l'eau*, Dosage de la chlorophylle a et d'un indice phéopigments - Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire., AFNOR. 11 p.

Utermöhl H., 1958. Zur vervollkommnung der quantative phytoplanktonmethodik. Mitt. Int. Ver. Limnol., vol. 9, 1-38.

ANNEXES

Annexe 1 : Document type de relevé d'opération de contrôle (informatif).

Ce document peut subir des modifications, voir les mises à jour sur le site Internet dédié (<https://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/>).

Relevé phytoplanctonique en cours d'eau DONNEES GENERALES OPERATION DE CONTROLE	v.2 Décembre 2010
---	----------------------

Cours d'eau :		Date :	
Nom station :		Code station :	
Organisme / opérateur :		Réf. dossier :	

POINT DE PRELEVEMENT

Coordonnées du point :	relevées sur : <input type="checkbox"/> GPS <input type="checkbox"/> carte IGN (en m) X : Y : altitude : m WGS 84 (système international) : données GPS (en dms) N : altitude : m
Conditions d'observation :	hydrologie : <input type="checkbox"/> pas d'eau <input type="checkbox"/> trous d'eau, flaques <input type="checkbox"/> basses eaux <input type="checkbox"/> moyennes eaux <input type="checkbox"/> hautes eaux <input type="checkbox"/> crue débordante <input type="checkbox"/> inconnu météo : <input type="checkbox"/> temps sec ensoleillé <input type="checkbox"/> temps sec faiblement nuageux <input type="checkbox"/> temps sec fortement nuageux <input type="checkbox"/> temps humide <input type="checkbox"/> pluie fine <input type="checkbox"/> orage, pluie forte <input type="checkbox"/> neige <input type="checkbox"/> gel <input type="checkbox"/> conditions crépusculaires fond visible : <input type="checkbox"/> bonne visibilité : substrat identifiable sans erreur <input type="checkbox"/> visibilité moyenne : doute sur l'identification de certains substrats ou visibilité réduite <input type="checkbox"/> visibilité faible : fonds justes discernables ou visibles sur une faible part de la zone concernée <input type="checkbox"/> fonds non visibles <input type="checkbox"/> inconnu Bloom algal : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non
Remarques :	

PRELEVEMENTS

Heure de début de relevé :		Heure de fin de relevé :	
Prélèvement :	<input type="checkbox"/> depuis un pont <input type="checkbox"/> depuis une embarcation <input type="checkbox"/> depuis la berge		
Prélèvements réalisés :	<input type="checkbox"/> phytoplancton <input type="checkbox"/> chlorophylle <input type="checkbox"/> eau	Matériel employé :	<input type="checkbox"/> bouteille Van Dorn <input type="checkbox"/> bouteille à messenger <input type="checkbox"/> perche + flacon
Volume filtré pour la chlorophylle :	ml	Volume de Lugol ajouté pour le phytoplancton :	ml

PHYSICO-CHIMIE

Heure	Secchi (m)	Temp (°C)	pH	Conductivité à 25°C (µS.cm ⁻¹)	O ₂ (%)	O ₂ (mg/l)
Remarques, observations :						

Annexe 2 : Document type de caractérisation de la station de mesure d'un cours d'eau et du point de contrôle (informatif).

Ce document peut subir des modifications, voir les mises à jour sur le site Internet dédié (<https://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/>).

DONNEES GENERALES STATION – POINT DE PRELEVEMENT

Décembre 2010

Cours d'eau :		Date :	
Nom station :		Code station :	
Organisme / opérateur :		Réf. dossier :	

LOCALISATION POINT DE PRELEVEMENT

Commune :			
HER :	:	Superficie du bassin versant :	km ²
Coordonnées du point	relevées sur : <input type="checkbox"/> GPS <input type="checkbox"/> carte IGN		
Lambert 93 (système français)	(en m) X :	Y :	altitude : m
WGS 84 (système international)	données GPS (en dms) N :	— :	altitude : m
Carte : (extrait IGN 1/25 000ème)	<div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 100%; position: relative;"> <div style="position: absolute; top: 10px; right: 10px; background-color: yellow; padding: 2px;">Indiquer le Nord</div> </div>		
Photos du site : (indiquer l'angle de prise de vue sur la carte)	<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1; border: 1px solid black; height: 100%;"></div> <div style="flex: 1; border: 1px solid black; height: 100%;"></div> </div>		
Remarques et observations :			

Annexe 3 : Préparation des fixateurs.

SOLUTIONS DE FIXATION DES ECHANTILLONS

1- La solution iodo-iodurée de Lugol alcalin

- Iode en paillettes 10 g,
- Iodure de potassium 20 g,
- Acétate de sodium 20 g,
- Eau distillée 200 ml.

Broyer au mortier l'iode (I_2) et l'iodure de potassium (IK) avec un peu d'eau. Compléter en eau distillée. Agiter jusqu'à complète dissolution.

Puis ajouter 20 g d'acétate de sodium ($CH_3COO-Na$). Lorsque la solution est proche de la saturation, il convient d'éliminer tout précipité éventuel en faisant décanter la solution avant utilisation.

UTILISATION : ajouter à l'eau de l'échantillon pour une concentration finale de **0,5%, soit 8 gouttes pour 100ml** afin d'obtenir une couleur brun clair (whisky). Si perte de cette couleur dans le temps alors ajouter quelques gouttes de plus.

IDENTIFICATION DES DANGERS : Produit non considéré comme dangereux selon la Directive 67/548/CEE.

2- La solution de glutaraldéhyde

- glutaraldéhyde à 50 %,
- cacodylate de sodium.

Tamponner la solution de glutaraldéhyde avec le cacodylate de sodium à pH neutre.

UTILISATION : ajouter à l'eau de l'échantillon pour une concentration finale de **0,5 %**

IDENTIFICATION DES DANGERS : Nocif en cas d'ingestion. Toxique par inhalation. Provoque des brûlures. Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et par contact avec la peau. Très toxique pour les organismes aquatiques.

3- La solution de formol

Solution de formol du commerce à 37 % de formaldéhyde.

UTILISATION : ajouter à l'eau de l'échantillon pour une concentration finale de **5 %** (en volume).

IDENTIFICATION DES DANGERS : Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Provoque des brûlures. Toxique: danger d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Effet cancérigène suspecté - preuves insuffisantes. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

Annexe 4 : Méthodologie de filtration et de conditionnement *in situ* de l'échantillon pour l'analyse de la Chlorophylle-a

FILTRATION *IN SITU* DE L'ÉCHANTILLON POUR LA CHLOROPHYLLE-A

Dans le cas où la filtration peut être réalisée sur place, le protocole de filtration et de conditionnement est le suivant :

La filtration est effectuée à l'aide d'une pompe à vide (manuelle ou électrique), après **homogénéisation de l'échantillon**, sur un filtre en fibre de verre ou en acétate de cellulose d'une porosité de 0,7 μm (type GF/F de Whatman). Le volume filtrable dépend de la nature et de la quantité de matières en suspension présentes dans l'eau. Le volume filtré doit **impérativement être mesuré et noté**, avec une précision donnée par une éprouvette graduée incassable manipulée sur le terrain. On filtre alors le maximum de volume d'échantillon (maximum 1000 ml), jusqu'à colmatage du filtre ou jusqu'à une durée maximale de 10 minutes, avec une dépression nécessaire à la filtration la plus faible possible. Ce protocole correspond aux prescriptions de la norme NF T 90-117 1999.



Il ne faut en aucun cas toucher les filtres avec les doigts mais utiliser des pinces pour les manipuler (risque de détérioration par l'acidité des mains).

CONDITIONNEMENT DU FILTRE POUR LA CHLOROPHYLLE-A

Le filtre est alors placé dans un tube à centrifugation de 15 ml à usage unique (pour éviter toute contamination) puis stocké immédiatement au froid à 4 degrés et à l'obscurité jusqu'à l'extraction ou la congélation au laboratoire. Sont inscrits sur le tube le nom du cours d'eau, de la station, la date et le volume filtré. Ces informations sont aussi inscrites sur la fiche « données générales » de la campagne.

La conservation en glacière permet aussi de protéger de la lumière l'échantillon sur filtre destiné au dosage de la chlorophylle.

L'échantillon sur filtre peut être congelé, pour analyse ultérieure. Sa conservation dans cet état peut alors être portée à 12 mois maximum.



Direction générale
Parc de Tourvoie
BP 44 - 92163 Antony cedex
Tél. 01 40 96 61 21 - Fax 01 40 96 62 25
www.cemagref.fr