

Phytoplancton Test inter laboratoires BENEFRRI 2008

Avant-Propos

Introduction

Le test inter laboratoires consiste à comparer les résultats d'analyses obtenus par deux analystes, Katrin Guthruf (Laboratoire de protection des eaux et des sols, canton de Berne) et François Straub (bureau PhycoEco pour le SCPE cantons de NE). La procédure d'analyse est la méthode simplifiée (presque commune) fixée en 1998-1999 dans le cadre de la collaboration BENEFRRI pour le suivi phytoplanctonique des lacs de Bienne, Morat et Neuchâtel. Cette méthode est utilisée par ailleurs pour le suivi d'autres lacs programmés par les cantons concernés.

La comparaison a pour but de savoir si cette méthode et son application par deux analystes différents permet d'obtenir les résultats escomptés, de jauger leur variabilité, identifier les causes de variabilité, et le cas échéant améliorer l'application de la méthode. L'analyse critique et la discussion des résultats a été réalisée en commun à Berne par K. Guthruf, M. Zeh et F. Straub le 7 novembre 2008.

Echantillons

Chaque analyste a procédé à l'analyse complète des deux échantillons suivants, de la réception des prélèvements à la production des résultats :

Lac de Bienne, station BIE4, intégration 0-15 m, 8 août 2008

Lac de Neuchâtel, station A, intégration 0-20 m, 7 août 2008

Des échantillons estivaux ont été choisis, car c'est à cette période de l'année que le phytoplancton est le plus diversifié et que l'analyse (en particulier l'identification des espèces d'algues, toujours entachée d'une certaine subjectivité) est la plus difficile à réaliser.

Différences structurelles entre l'application de la méthode par les deux analystes

Malgré la tentative de standardisation de la méthode, les différences suivantes subsistent ou ont été constatées :

a) microscopes

K. Guthruf dispose d'un microscope inversé Zeiss (modèle Axiovert 135) récent, très ergonomique et stable, à éclairage en contraste de phase à grand champs visuels et éclairage halogène puissant.

F. Straub dispose d'un microscope inversé Meopta (modèle TAH3) ancien peu stable, avec optique Wild, un éclairage à fond clair, à petits champs visuels et éclairage classique peu puissant.

b) fixation des échantillons

K. Guthruf dénombre la plupart des espèces dans l'échantillon fixé au Lugol/acide acétique (d'après Vollenweider 1969), et quelques espèces sensibles à l'acide, dans un sous échantillon fixé au U-Lugol/acétate de sodium (d'après Utermöhl 1958), comme le faisait Mme Zbären pour les lacs bernois et le lac de Morat.

F. Straub dénombre toutes les espèces dans le sous échantillon fixé au U-Lugol/acétate de sodium (d'après Utermöhl 1958), comme le faisaient M. Wuthrich et B. Pokorni pour le lac de Neuchâtel.

Ces différences sont susceptibles d'introduire des différences dans les résultats. La première dans l'identification de certaines espèces plus aisée avec le microscope Zeiss ou simplement dans la mise en évidence de certains taxons (non visibles avec le microscope Meopta). Les champs microscopiques des deux microscopes n'ayant pas la même taille, des différences de dénombrement sont possibles. Enfin la fixation des échantillons n'étant pas rigoureusement identique, on peut s'attendre à quelques différences dans les listes floristiques (présence/absence de certains taxons, état de conservation de certains taxons).

c) dénombrements

Parfois les espèces ne sont pas dénombrées au même grossissement par KG et FS. C'est aussi le cas d'un mois à l'autre, chez chacun, selon la concentration différente de certaines espèces. Cette différence dans les dénombrements a certainement eu un effet majeur dans l'écart mis en évidence (de biodiversité structurale) entre les deux analyses (voir 2^e partie de la question 6).

Résultats bruts

Les résultats bruts des dénombrements des deux échantillons sont présentés dans les deux tabelles jointes en annexes I et II. Sur ces tabelles, on trouve les résultats des deux analystes pour les biomasses et pour les dénombrements des cellules de chaque espèce. Dans l'annexe III on trouve les résultats des calculs de deux indices de similitudes destinés à comparer les dénombrements. Les résultats détaillés sont présentés ci-dessous par rapports aux questions soulevées par ce genre de test comparatif.

Comparaisons des résultats

Etalonnages et calculs

Question 1: est-ce que l'étalonnage des deux microscopes pour l'estimation des concentrations cellulaires et les méthodes de calculs utilisés par les deux analystes sont comparables ?

Oui ils le sont car les concentrations des espèces très typiques sont du même ordre de grandeur pour les deux analystes. C'est le cas par exemple pour Ceratium hirundinella, Salpingoeca frequentissima, Aphanizomenon flos-aquae, Aphanocapsa holsatica, Chrysolykos plancticus, Cyclotella/Stephanodiscus < 9 µm dans le lac de Neuchâtel, ou Ceratium hirundinella, Gymnodinium helveticum, Peridinium cunnigntonii, Cyclotella/Stephanodiscus > 9 µm, Asterionella formosa, Chrysochromulina parva, Dinobryon divergens ou les unbestimmte Flagellaten < 5 mm, dans le lac de Biemme. Globalement le nombre de cellules par litre est du même ordre de grandeur comme le montre le tableau ci-dessous.

	<i>K. Guthruf</i>	<i>F. Straub</i>
	<i>Nombre de cellules/litre</i>	<i>Nombre de cellules/litre</i>
Biemme	<i>18.02x10⁶</i>	<i>14.76x10⁶</i>
Neuchâtel	<i>33.35x10⁶</i>	<i>40.53x10⁶</i>

Les différences sont minimales et non significatives en microbiologie dans le cadre de l'estimation de concentrations cellulaires (car il suffit d'une mitose pour doubler la population de cellules).

Question 2: est-ce que l'étalonnage des micromètres des microscopes est correcte, vs les mesures des tailles des individus sont-elles comparables entre les deux analystes ?

Ces étalonnages sont à vérifier car quelques résultats surprenants sont apparus : dans l'échantillon Bienne KG ne trouve que des Stephanodiscus > 30 µm, alors que FS ne trouve que des Stephanodiscus < 30 µm, à Neuchâtel KG ne trouve que des Chlamydomonas < 11 µm, alors que FS n'en trouve que des > 11 µm, KG ne trouve que des Pseudokephyrion (grands) alors que FS ne trouve que des Kephyrion (petits). Pour les Stephanodiscus ces différences peuvent s'expliquer car après vérification les cellules ont environ 30 µm de diamètre. Pour les deux autres espèces le hasard en est peut-être la cause, vu la faible concentration de ces deux taxons. Voir point 8.1.

Resultats (globaux)

Question 3 : est ce que les estimations de biomasses totales sont comparables ?

Les résultats de biomasses par groupe d'algues et totales sont données dans le tableau ci-dessous.

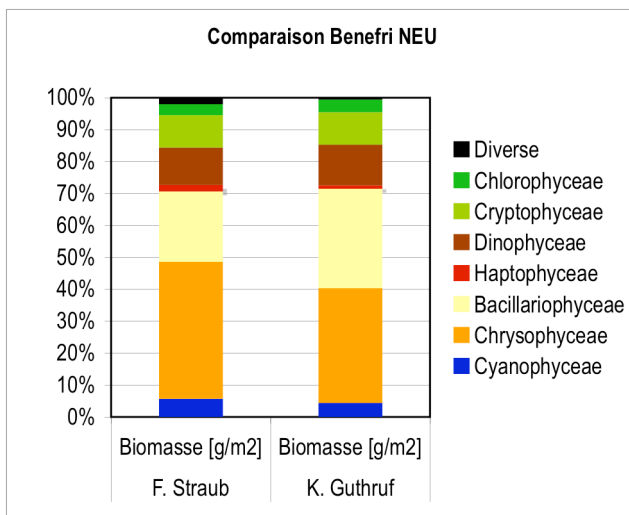
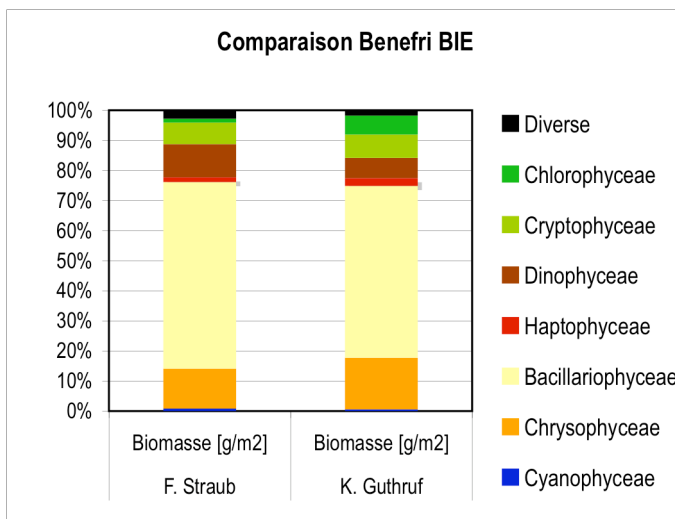
	Bienne		Neuchâtel	
	K. Guthruf Biomasse [g/m ²]	F. Straub Biomasse [g/m ²]	K. Guthruf Biomasse [g/m ²]	F. Straub Biomasse [g/m ²]
Cyanophyceae	0.08	0.11	0.40	0.50
Chrysophyceae	2.20	1.73	3.25	3.75
Bacillariophyceae	7.32	8.09	2.82	1.92
Haptophyceae	0.34	0.21	0.10	0.18
Dinophyceae	0.86	1.44	1.16	1.02
Cryptophyceae	1.00	0.93	0.92	0.88
Chlorophyceae	0.80	0.17	0.36	0.30
Diverse	0.22	0.36	0.05	0.18
Total	12.60	12.68	9.00	8.56

Oui les estimations de biomasse totale (en rouge) sont comparables ou même très proches (comme forcément les nombres de cellule par litre). En microbiologie, par dénombrement, on ne peut pas obtenir de meilleurs résultats.

Question 4: est-ce que les proportions de biomasse des différents groupes d'algues sont comparables ?

Ces proportions estimées figurent dans le tableau ci-dessus et sont représentées graphiquement ci-dessous.

Dans l'échantillon du lac de Bienne, quelques différences apparaissent : les Chrysophycées et les Chlorophycées sont sous-estimées par FS par rapport à l'estimation de KG. Par contre FS surestime les diatomées par rapport à KG. Ces différences (en particulier celle qui concerne les Chlorophycées et les diatomées) seront plus amplement discutées sous la question 7.



Dans l'échantillon du lac de Neuchâtel par contre, les différences sont moindres, si ce n'est de nouveau cette différence entre diatomées et Chrysophycée (cette différence ne porte cependant que sur moins de 10% de la biomasse totale).

Question 5 : chez les Cyanophycées (genres *Aphanocapsa* et *Aphanothece*), est-ce que l'estimation du nombre de cellules dans les colonies (nombre impossible à compter) est comparable ?

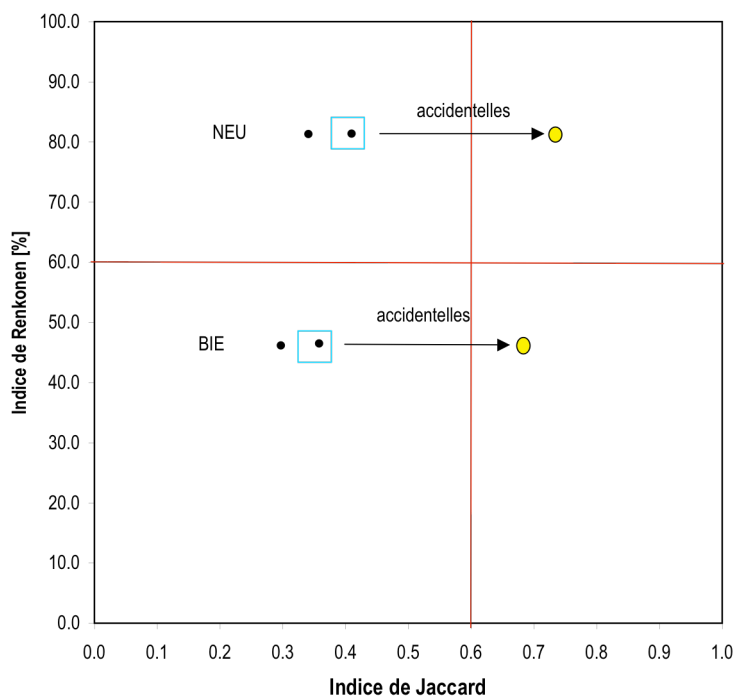
Oui cela a été vérifié sur les listes originales. Par contre le dénombrement de ces colonies pose un problème discuté dans la 2^e partie de la question 6.

Question 6 : est-ce que les biodiversités floristiques (types d'espèces identifiées) et les biodiversités structurales (proportions dénombrées pour chaque espèce) sont comparables entre les deux analystes ?

Pour résoudre cette question complexe (comparaison détaillées des listes et dénombrement des deux analystes) deux indices de comparaison ont été utilisés : l'indice de Jaccard, permet de comparer la teneur des listes floristiques et l'indice de Renkonen (dominance-identité) permet de comparer les proportions de chaque espèce relevées (Straub 2007). Ici la

comparaison des proportions a été étudiées sur les % de cellules dénombrées, car ce critère est plus sévère que les % de biomasse de chaque espèce. Pour le jugement, les valeurs de ces deux indices sont présentées sur le graphique comparatif ci-dessous. **Vu la variabilité inhérente au dénombrement sous le microscope, des valeurs ≥ 0.6 d'indice de Jaccard indiquent que les deux listes floristiques proviennent du même échantillon, des valeurs $\geq 60\%$ d'indice de Renkonen indiquent la quasi identité structurale entre deux dénombrements.**

Il saute aux yeux que les listes floristiques ne sont pas comparables dans le détail (moins de 35% de similitude = points noirs, indice de Jaccard). Il faut cependant dire que les 30 à 35% d'espèces citées en commun par les deux analystes forment plus du 90% de la biomasse. Si l'on considère qu'une partie des différences est liée à l'emploi de synonymes et qu'on annule cet effet en les comptant ensemble (voir annexes I et II, taxons en couleur), on obtient les valeurs encadrées en bleu (35 à 40% de similitude). Parmi le 60 à 65% restant, il y a 35 % d'espèces, vues par l'un ou l'autre analyste (mais que chacun reconnaît). Il s'agit d'espèces accidentelles (qui ensemble représentent moins de 10% de la biomasse), que le hasard a fait omettre à l'un ou l'autre analyste. En doublant le temps de travail, ces espèces auraient en grande partie été observées et reconnues par les deux analystes.



Cette alternative permettrait sans doute d'obtenir des similitudes floristiques de 70 à 75% entre les deux analystes (points jaunes) ce qui prouverait au point de vue floristique que les analyses ont été réalisées sur les mêmes prélèvements. Pour les 25 à 30% restant, nous avons découvert un certain nombre de différences ou d'erreur d'identification de certaines espèces. Les cas principaux sont discutés sous la question 7.

Pour ce qui est de l'identité structurale des deux dénombrements (est-ce que les proportions de chaque espèce sont semblables ?), pour l'échantillon du lac de Neuchâtel, la valeur de l'indice de plus de 80%, très bonne, indique que les deux analyses ont été réalisées sur le

même prélèvement. Par contre pour le lac de Biemme, il n'y a que 45% de similitude entre les deux dénombrements. Les différences ne se marquent pas énormément sur les parts de biomasse des grands groupes d'algues (cf. question 4), mais indiquent tout de même des différences qu'il s'agit d'éclaircir. Cet écart entre les dénombrements provient presque totalement de la différence d'estimation de la concentration d'Aphanothece clathrata (KG : 11.5% et FS 53.5 %). Cette différence n'est pas liée à l'estimation du nombre de cellules par colonie (nous l'avons vérifié ensemble), mais provient du fait que KG dénombre les cellules de ces colonies au grossissement 100x10, tandis que FS les dénombre au grossissement 20x10 (comme le faisaient respectivement leurs prédécesseurs !). Après discussion, nous sommes d'avis que le dénombrement des cellules de ces grosses colonies à 100x10 abouti à une sous-estimation de leur concentration pour deux raisons : les colonies sont plus grosses que le champ visuel à 100x10, la profondeur de champ de l'objectif 100x est beaucoup trop faible, si bien que beaucoup de colonies, qui restent en suspension et ne sédimentent pas totalement dans la chambre de comptage, ne sont pas dénombrées. Par ailleurs, le dénombrement sur 10 champs visuels choisis au hasard à 100x10, a probablement passé à côté de grosses colonies. Il faut remarquer que cette erreur de dénombrement ne s'est pas reportée (ou de façon moindre) sur les colonies d'Aphanocapsa holsatica, probablement par le fait que cette seconde espèce forme de petites colonies compactes qui sédimentent bien. Il est vrai qu'à 20x10 l'identification entre ces espèces n'est pas très aisée, mais les indications de remédiation données au **point 8.2** devraient suffire.

Cet écart entre les dénombrements des deux analystes provient aussi dans une moindre mesure d'erreurs ou différences d'identification (donc de dénombrement de certaines cellules) évoquées ci-dessus et détaillées à la question 7.

Question 7 : quelles sont les différences d'identification les plus importantes ?

7.1 : ce qu'on appelle les μ -Algen est très indéfini. Il n'y a pas de définition bien nette pour ces petites cellules d'environ 1 μ m de diamètre. Or la biomasse de ces petites cellules n'est pas négligeable, d'autant plus dans les lacs eutrophes. KG dénombre toutes les petites cellules de cette sorte (qu'elles soient vert salade, vert-bleu, grises ou transparentes). FS ne dénombre sous ce nom que les cellules vert salade, car ce « taxon » est associé aux algues vertes. Pour lui, les autres sont soit des cellules d'algues bleues détachées des colonies ou encore de petits protozoaires ou de grosses bactéries. Cette différence de dénombrement explique l'essentiel de la différence d'estimation de la biomasse des chlorophycées entre les deux analystes. **Voir point 8.3.**

7.2 : parmi les diatomées, les cellules allongées, plus ou moins fines de différentes espèces de Fragilaria, ne sont pas identifiables correctement au microscope inversé (on ne perçoit pas les critères qualitatifs, seules les différences de taille sont visibles). Cela concerne plus précisément Fragilaria ulna var. acus, F. ulna var. angustissima, F. capucina var. rumpens, F. tenera et F. nanana. Même en microscopies normale et électronique, ces taxons posent de gros problèmes d'identification comme le relève H. Lange-Bertalot dans la flore d'Europe centrale (Krammet & Lange-Bertalot 1991). **Voir point 8.4.**

7.3 : parmi les petites algues bleues isolées des différences d'identification ont été relevées entre les taxons Synecococcus sp et Cyanobium plancticum. Les différences qualitatives entre ces taxons ne sont pas non plus perceptibles en microscopie inversée, seule la taille semble différente. **Voir point 8.5.**

7.4 : parmi les algues vertes coloniales, des confusions sont possible entre *Pseudosphaerocystis lacustris*, *Sphaerocystis schroeterii* et *Radiococcus sp.* confusions citées dans la littérature (Komarek et Fott 1983). Par ailleurs, nous ne savons pas comment appeler certaines petites colonies à 4 ou 8 cellules de 2-4 μm de diamètre (il s'agit peut-être de spores multicellulaires de Volvocales. **Voir point 8.6.**

7.5 : d'autres problèmes d'identification ont été relevés, mais ils ont une influence mineure sur les différences de dénombrement. Pour mémoire il s'agit de l'identité de *Bitrichia sp* (Chrysophycée) par rapport à *Schroederia setigera* (Chlorophycée), de *Pseudanabaena limnetica* (Cyanophycée) par rapport à *Achroonema angustum* (Bactérie).

Remédiations

Les différences relevées au cours de ce test et qui causent des différences de dénombrement sont dans l'ordre d'importance :

- a) des différences dans l'emploi des microscope (dénombrement à des grossissements différents, mesures) ;
- b) des différences d'identification (ce qui ressort aussi d'autres tests inter laboratoires auxquels nous avons participé).

Pour réduire cet écart, dans le but de mieux pouvoir comparer les communautés des trois grand lacs sub-jurassiens) nous nous sommes accordés, KG et FS, sur les propositions suivantes (on peut se demander s'il est opportun de le faire, si le suivi des lacs pour eux-mêmes est plus important) :

Point 8.1 : vérifier l'étalonnage des micromètres. Plus souvent mesurer les diamètres des cellules.

Point 8.2 :

Dénombrer les cellules des Cyanophycées coloniales à 20x10 (en particulier *Aphanocapsa holsatica* et *Aphanothece clathrata*).

En général les colonies d'*Aphanocapsa holsatica* ont moins de 100 cellules par colonie. Ces cellules sont sphériques (à vérifier à 40x10) et dans la plupart des cas très rapprochées les unes des autres.

Les colonies d'*Aphanothece clathrata* comportent souvent plus de 100 cellules allongées (à vérifier à 40x10), en général distantes les unes des autres. Souvent les colonies peuvent atteindre 500 ou 1000 cellules.

Point 8.3 : nous sortons les μ -Algen des Chlorophycées et nous remplaçons ce terme par μ -Zellen que nous considérons à part. Sous ce nom nous dénombrons toutes les petites cellules isolées d'environ 1 μm de diamètre sans distinction. Ce groupe hétérogène rassemble de grosses bactéries, de petits protozoaires, des spores de champignons, des cellules détachées de Cyanophycées, de petites Chlorophycées ou des spores de Chlorophycées.

Point 8.4 : nous laissons tomber la dénomination de *Fragilaria nanana* qu'il est impossible de différencier de *F. tenera*.

Nous adoptons les différences de taille suivante :

Fragilaria capucina var rumpens : 50 à 70 μm de long

Fragilaria tenera : > 70 à 100 μm de long

Fragilaria ulna var acus : > 100 à 200 μm de long

Fragilaria ulna var angustissima : >200 μm de long

Point 8.5 : pour les petites Cyanophycées isolées nous adoptons les classes de taille suivantes :

Cyanobium plancticum : de 2 - 3 μm de long

Synecococcus sp. : >3 μm à environ 6 μm

Point 8.6 :

Pseudospharocystis lacustris forme des colonies de 16 à 32 cellules ou plus, mais dans lesquelles les cellules forment des groupes de 4.

Sphaerocystis schroeteri forme des colonies de 8 à 16 cellules groupées ensemble. Parfois chez cette espèce, on peut trouver dans les colonies, des résidus de vieilles enveloppes, dans l'enveloppe vivante. Cela peut créer une confusion avec Radiococcus sp. Mais le genre Radiococcus forme des colonies avec plusieurs groupes de quatre cellules.

Chez les Chlorophycées, pour les petites colonies de cellules de 2-4 μm de diamètre nous proposons la dénomination : Kleine kolonialen Grünalgen (Zellen ca. 2-4 μm Diameter). Il faut donner un numéro de taxon à cette dénomination. Pour une taille moyenne de 3 μm de diamètre, ces cellules ont un biovolume de 14,137 μm^3 .

Conclusion

La méthode simplifiée BENEFRI d'analyse phytoplanctonique (qui demande un investissement de 4 à 5 heures de travail) permet d'obtenir :

- une bonne estimation de la biomasse totale
- une bonne estimation de la part de biomasse des grands groupes d'algues
- une bonne estimation de la biodiversité structurale de la communauté si les analystes adoptent les recommandations énoncées ci-dessus.

Ces trois critères forment l'essentiel des besoins analytiques pour le diagnostic de qualité d'eau.

Par contre cette méthode ne permet pas :

de relever la biodiversité floristique totale des échantillons. Cette méthode ne permet que d'en relever la flore dominante. Pour obtenir une meilleure estimation de la flore totale, il serait nécessaire d'augmenter l'effort d'analyse, au moins en doublant le temps de travail.

Remarque

Pour ce test, les échantillons estivaux choisis sont les plus complexes à analyser. Vu la comparaison des résultats, on peut s'attendre à une similitude meilleure des résultats des deux analystes pour les échantillons plus spécialisés hivernaux et printaniers.

Bibliographie

- Komarek, J. & Fott, B., 1983. Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung: Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (ed). *Das Phytoplankton des Süßwassers* 7(1). E. Schweizerbart'sche Ver., Stuttgart : 1-1044.
- Krammer, K. et Lange-Bertalot, H., 1991. Bacillariophyceae, Teil. 3 : Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In. Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds) : *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (begr. von A.Pascher), G. Fischer, Stuttgart, Band 2/3: 1-576.
- Straub, F., 2007. *Diatomées et qualité des eaux de rivières : méthodes du bureau PhycoEco* (corr. et compl. octobre 2008). Polycopié du bureau PhycoEco, La Chaux-de-Fonds, 12 pages.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Mitt. Int. Verein theor. angew. Limnol.* 9 : 1-38.
- Vollenweider, R. A., 1969. *A Manual on Methods for measuring Primary Production in Aquatic Environments*. Ed. Blackwell, London, IBP 12, 213 p.

Texte rédigé par F. Straub , corrigé et amandé par Katrin Guthruf

La Chaux-de-Fonds, le 4 février 2009

Annexe en CD-Rom :

Texte du rapport en Word et pdf

Annexe I : biomasses comparatives des grands groupes d'algues

Annexe II : dénombrements en nombres de cellules par litre

Annexe III : calcul et valeurs des indices de similitude