

Méthode d'analyse en sécurité sanitaire dans les eaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LHN/CYAMF- Version 1 (En consultation)

Novembre 2018

**Dénombrement et identification des
cyanobactéries dans les eaux
intérieures après observation directe
de l'échantillon ou après concentration
par filtration.**

Laboratoire d'Hydrologie de Nancy,

Laboratoire National de Référence Eaux Destinées à la Consommation

Humaines, Eaux Minérales Naturelles et Eaux de Loisirs

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



1

Historique de la Méthode

2

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

3

4

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

8

9

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

12

13

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

15

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1			
v2			
vx			

16

17



18

19

Avant-propos

20 La présente méthode a été développée par :

21 **Anses - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy**

22 Laboratoire National de Référence des Eaux Destinées à la Consommation Humaine,
23 Eaux Minérales Naturelles et Eaux de Loisirs

24 Adresse : 40 rue lionnois, 54 000 NANCY

25 Contact : Thierry CHESNOT,

26 hydrologie.nancy@anses.fr, thierry.chesnot@anses.fr

27

28 Ont participé à l'élaboration de ce document au sein d'un groupe de travail animé par le Laboratoire d'Hydrologie de
29 Nancy :

- 30 - Luc BRIENT, Université de Rennes I, U.M.R. ECOBIO. Formateur auprès des laboratoires d'analyses des
31 eaux pour le dénombrement des cyanobactéries (méthode de concentration par filtration).
32
- 33 - Christophe LAPLACE-TREYTURE, IRSTEA, Hydrobiologie Algologie. Rédacteur du protocole standardisé,
34 d'échantillonnage, de conservation, d'observation et de dénombrement du phytoplancton en plan d'eau pour
35 la mise en œuvre de la DCE.
36
- 37 - Maria LEITAO, Bi-Eau, bureau d'études spécialisé en algologie. Formatrice dans les entreprises, et auprès
38 des laboratoires d'analyses des eaux pour le dénombrement des cyanobactéries (méthode de sédimentation
39 selon Utermöhl).
40
- 41 - Jacques PERNEY, ARS Nouvelle-Aquitaine, Pôle Santé Environnementale, Direction de la Santé Publique,
42 en charge de la thématique « cyanobactéries ».
43
- 44 - Thierry CHESNOT, ANSES, Laboratoire d'Hydrologie de Nancy, Animateur du groupe de travail.
45

46

47



48 1. Domaine d'application

49 Le présent document spécifie une méthode permettant d'établir la concentration en cyanobactéries et la liste des
50 genres présents dans des eaux intérieures (lacs, étangs, retenues d'eau et autres masses d'eau) qui accueillent des
51 activités de baignade et/ou de loisirs nautiques, ou qui seraient utilisées en tant que ressources superficielles pour
52 produire des eaux de consommation humaine. Cette méthode peut également être utilisée pour contrôler le niveau
53 de contamination d'eaux de consommation distribuées en réseau. La méthode repose sur une observation
54 microscopique. Elle est applicable quelle que soit la concentration en cyanobactéries sous réserve que le volume
55 d'échantillon analysé soit adapté au niveau de contamination de l'échantillon. La méthode n'est pas adaptée au
56 dénombrement de l'ensemble des picocyanobactéries (< 2 µm) mais permet cependant la prise en compte des
57 individus coloniaux de cyanobactéries composés de cellules de petites tailles (ex : *Aphanocapsa*, *Cyanogranis*,
58 *Cyanodictyon*, ...).

59 2. Références normatives ou documentaires

- 60 - AFNOR, 2006. Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode
61 Utermöhl) – NF EN 15 204. 39 pp.
- 62 - AFNOR, 2006. Qualité de l'eau – Échantillonnage pour analyse microbiologique – NF EN ISO 19 458. 18 pp.
- 63 - ASTM D 4118 : Standard test method for analysis of phytoplankton in surface water by the Sedgewick-Rafter
64 method. 4 pp.
- 65 - CEMAGREF, 2009. Protocole standardisé - phytoplancton – septembre Version 3.3.1. Protocole standardisé
66 d'échantillonnage, de conservation, d'observation et de dénombrement du phytoplancton en plan d'eau pour
67 la mise en œuvre de la DCE. 44 pp.
- 68 - Guide de l'agence de l'eau Seine Normandie, 2005. Guide pratique des cyanobactéries planctoniques du
69 grand Ouest de la France. 63 pp.
- 70 - Greeson, P.E., T.A, Ehlke, G.A, Irwin,, B.W, Lium y K.V. Slack, 1977. Methods for Collection and Analysis of
71 Aquatic Biological and Microbiological Samples. U.S.A. Geology Survey. Technology of Water-Resources
72 Investigations, Book 5, Chapter 4. 332 pp.
- 73 - Joosten A.M.T., 2006: Flora of the blue-green algae of the Netherlands, I – The non-filamentous species of
74 inland waters. KNNV, Utrecht, 239 pp.
- 75 - Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, P., 2015. Freshwater algae of North America: ecology and classification,
76 2° ed. ed. Academic press, Amsterdam, NLD
- 77 - Komarek J. et Anagnostidis K. (1999): Cyanoprokaryota, 1. Teil/ 1st Part: Chroococcales. In: Ettl H,
78 Gärtner G, Heynig H and Mollenhauer D (Eds) Süßwasserflora von Mitteleuropa, 19/1, Gustav Fischer,
79 Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 pp.
- 80 - Komarek J. et Anagnostidis K. (2005): Cyanoprokaryota -2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. – In: Büdel B.,
81 Krienitz L., Gärtner G. & Schagerl M. (Eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Elsevier/Spektrum,
82 Heidelberg, 759 pp.
- 83 - Komárek J. (2013): Cyanoprokaryota - 3. Teil/ 3rd part: Heterocytous Genera. – In: Büdel B., Gärtner G.,
84 Krienitz L. & Schagerl M. (Eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa (Freshwater Flora of Central Europe),
85 Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 1130 pp.
- 86 - Rapport AFSSA/AFSSET, 2006. Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs
87 toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. 227 pp.

88

89



3. Termes et définition

- 90
- 91 - Colonie : Ensemble de cellules regroupées avec ou sans ordre défini (à l'intérieur d'un
- 92 mucilage par exemple), constituant une unité fonctionnelle.
- 93 - Concentrat : Volume obtenu après remise en suspension du filtrat dans 1 ml d'eau
- 94 déminéralisée.
- 95 - Individu : Concernant les cyanobactéries, un individu peut être unicellulaire, pluricellulaire,
- 96 colonial ou filamenteux
- 97 - Filament : Empilement linéaire de cellules entourées d'une gaine. En l'absence de gaine, un
- 98 filament est assimilable à un trichome.
- 99 - Filtrat : Ensemble des particules d'origine biologique (biomasse phytoplanctonique) ou non
- 100 présent à la surface de la membrane de filtration en polycarbonate au terme de
- 101 l'étape de filtration.
- 102 - Gaine : Enveloppe de type mucilagineux qui entoure des groupes de cellules ou des
- 103 trichomes. Sa consistance est plus ou moins épaisse, structurée ou homogène.
- 104 - Lugol alcalin : Solution de lugol à laquelle est ajoutée de l'acétate de sodium.
- 105 - Photothèque : Base de données numériques taxonomiquement hiérarchisée, composée de clichés
- 106 de référence d'origine interne et éventuellement externe au laboratoire, mise à jour
- 107 en continu et dont la fiabilité peut être assurée.
- 108 - Pseudovacuole : Synonyme de vacuole à gaz chez les eucaryotes. Inclusion cellulaire des
- 109 cyanobactéries ayant un rôle dans la flottabilité mais aussi parfois dans la fixation de
- 110 l'azote atmosphérique.
- 111 - Trichome : Organisation en série linéaire, ramifiée ou non, de cellules cyanobactériennes non
- 112 enrobée d'une gaine.
- 113 - Unicellulaire : Se dit d'une cyanobactérie lorsque la plupart du temps de son cycle de vie, celle-ci
- 114 est composée d'une seule cellule (absence de filament, de trichome ou de colonie).
- 115 La cellule est alors assimilable à un individu.
- 116



117 4. Principe général

118 Le principe de la méthode consiste à concentrer le phytoplancton (dont les cyanobactéries) en suspension dans un
119 échantillon d'eau, sur une membrane en polycarbonate de 3 µm de porosité pour obtenir au final un millilitre de
120 concentrat dont une fraction sera examinée dans une cellule de Nageotte. En pratique, un volume connu
121 d'échantillon d'eau est filtré avec une unité de filtration placée sous vide. Une fois la totalité du volume d'eau filtrée,
122 le filtrat est récupéré à partir de la membrane en polycarbonate dans un volume de 1 ml pour former le concentrat.
123 Une fraction du concentrat est transférée dans une cellule de Nageotte dont le volume de comptage est de 50 µl. La
124 cellule est directement observable à l'aide d'un microscope droit pour dénombrer et identifier les genres de
125 cyanobactéries.

126 Les dénombrements sont systématiquement réalisés sur des échantillons préalablement fixés avec une solution de
127 lugol alcalin fortement concentrée. En complément une analyse qualitative (recensement des genres en présence)
128 est réalisable sur les échantillons reçus au laboratoire le jour même du prélèvement voire dans les 24 h après
129 prélèvement.

130 5. Liste des réactifs

131 **Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la
132 mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement
133 que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils
134 conduisent aux mêmes résultats.

135 La solution de lugol alcalin peut être réalisée selon les indications ci-après : Dissoudre dans 200 ml d'eau distillée ou
136 déminéralisée, 10 g d'iode cristallin (paillettes), 20 g d'iodure de potassium (KI), 20 g d'acétate de Sodium
137 (CH₃COO-Na). Dissoudre le mélange d'iode cristallin et de KI par agitation puis ajouter l'acétate de sodium. Lorsque
138 la solution est proche de la saturation, il convient d'éliminer tout précipité en faisant décanter la solution

139 *Note :* La dissolution de l'iode cristallin et de l'iodure de potassium peut être facilitée par une étape préalable de broyage au
140 mortier à réaliser dans un faible volume d'eau distillée ou déminéralisée.

141 Si une solution commerciale de lugol est utilisée, une attention particulière devra être portée à la composition de
142 cette dernière. Il est nécessaire de vérifier la cohérence avec la formulation de la solution de lugol alcalin décrite
143 dans la norme NF EN 15 204 et dans le protocole DCE [CEMAGREF 2009] reprise ci-dessus.

144 *Note :* Le lugol alcalin semble plus adapté que le lugol acide pour la fixation des eaux douces [NF EN 15 204 – Annexe B].
145 L'utilisation du lugol alcalin est également préconisée pour la conservation des échantillons dans le protocole de
146 référence applicable au dénombrement du phytoplancton dans le cadre de la DCE [CEMAGREF 2009].

147 *Note :* La solution de lugol s'oxyde à l'air et à la lumière. Elle doit être conservée à l'obscurité ou dans des flacons en verre
148 brun et à l'abri de la chaleur. Pour des raisons pratiques, une solution mère de lugol conservée dans des conditions
149 optimales, peut être utilisée pour alimenter des flacons compte-goutte de petite taille.

150 6. Matériel nécessaire et calibration associée

151 **Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels
152 nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne
153 signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est
154 démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

155


 156
157

6.1. Liste de matériels

 158
159

Tableau 1 : liste du matériel nécessaire pour le dénombrement des cyanobactéries dans les eaux de loisirs et les ressources superficielles, avec un microscope droit

	Dénomination du matériel	Caractéristiques attendues	Informations complémentaires	
1	a	Unité de filtration ¹ .	Une unité de filtration type comporte les éléments décrits ci-dessous.	
	b	Entonnoir de filtration.	Capacité minimale de 25 ml pour les eaux brutes. Capacité minimale de 100 ml ou plus pour les eaux traitées.	
	c	Système de dépression.	Pompe à vide (ou trompe à vide).	Dépression maximale de 700 mbar.
	d	Membrane polycarbonate.	Membrane blanche, Diamètre 47 mm, porosité de 3 µm.	
2	Boîte de Petri.	55 mm de diamètre.	Des boîtes en verre peuvent être préférables pour faciliter le grattage et le nettoyage.	
3	Grattoir ou doigt ganté.	De taille adaptée à celle de la membrane de filtration.	Gratter la totalité de la surface de la membrane.	
4	Cellule de comptage.	Cellule de Nageotte.	40 bandes de 250 µm de large chacune et d'1 mm de long. Hauteur d'eau 0,5 mm. Volume : 50 µl.	
5	Lamelle pour cellule de Nageotte.	Lamelle optiquement plane.		
6	a	Microscope droit.	<i>A minima</i> , nécessité de disposer d'un ensemble de grossissements compris entre (x100) et (x400). Certains microscopes ne permettent pas d'observer avec des objectifs classiques de x40 en raison de l'épaisseur des lames et lamelle, il convient donc d'utiliser des objectifs à courte distance focale (type métallurgie) à un grossissement à x50 et si besoin un objectif x100 à sec.	
	b	Oculaires micrométriques.	<i>A minima</i> (x10) Un oculaire avec graduations (micrométriques), un autre avec une grille de comptage étalonnée.	Des oculaires de (x12,5) ou (x15) permettant d'atteindre des grossissements supérieurs peuvent être utilisés.
	c	Lame Etalon.	Longueur de 1 mm divisée en 100 fractions de 10 µm.	Nécessaire à la calibration.
	d	Objectifs.	Obligatoirement : (x10) (x20) (x40) Facultativement : (x4), (x50), (x60) et (x100) – Pour les grossissements les plus importants, utiliser des objectifs à courte distance focale si nécessaire.	Dans le cadre d'une observation entre lame et lamelle, les objectifs (x60) et (x100) présentent un intérêt important pour l'identification de certains genres.

¹ Un système de filtration permettant d'accueillir une membrane en polycarbonate de 3 µm de porosité et d'un diamètre de 25 mm peut également être utilisée en remplacement sous réserve que le laboratoire dispose de données permettant de montrer que ce système permet d'atteindre des performances au moins équivalentes.



	f	Fond de microscope.	Fond clair.	Le fond clair est utilisé préférentiellement car lors de l'observation d'échantillons frais, il permet d'obtenir des informations sur la couleur des cellules ce qui facilite l'identification.
	g	Platine mobile micrométrique.		
	h	Appareil photo ou caméra numérique et logiciel.		Cet équipement reste optionnel mais il est fortement conseillé. Une résolution d'au moins 5 millions de pixels est nécessaire. Un logiciel permettant de prendre des mesures (longueur, largeur, diamètre) est également conseillé.
7		Ouvrage(s) de taxonomie.	Komarek J. et Anagnostidis K. (1999) Komarek J. et Anagnostidis K. (2005) Komárek J. (2013) Joosten A.M.T. (2006) Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, P., 2015	A cela s'ajoute : - d'autres ouvrages en rapport avec la région géographique d'origine des échantillons (si disponibles). - Obligatoirement une photothèque interne au laboratoire.
8	a	Matériel de nettoyage.	Selon les éléments listés ci-dessous	
	b	Détergents et/ou solutions alcooliques.		En fonction de la compatibilité avec le matériel de sédimentation et d'observation.
	c	Pinceau ou brosse de petite taille.		Taille adaptée au matériel utilisé.
9		Pipettes automatiques de 1 ml et de 5 ml.	Pipette automatique de 1 ml conseillée pour le transfert par capillarité du concentrat dans la cellule de Nageotte.	Privilégier l'utilisation de pointes de filtration à usage unique. Veiller à ce que le diamètre des pointes soit compatible avec la taille des individus de cyanobactéries la plus importante (> 3 mm).

6.2. Calibration de l'équipement :

Tableau 2 : Calibrations attendues en fonction du matériel et principe associé

Matériel concerné	Calibration attendue	Principe
Logiciel d'acquisition d'images et de mesures.	Vérification de la justesse des outils de mesure intégrés au logiciel	Il est possible d'utiliser une lame étalon.

6.3. Calculs à réaliser

La concentration en cellules par ml est déterminée à partir du volume total de la cellule de Nageotte (50 µl) et du nombre de bandes pris en compte pour le dénombrement sachant que chacune des bandes représente un volume de 1,25 µl.



168 7. Echantillonnage

169 Les modalités de prélèvement sont décrites dans le guide méthodologique ANSES.

170 Les échantillons doivent être acheminés vers le laboratoire dans une enceinte isotherme à une température
171 comprise entre $5+/-3^{\circ}\text{C}$ et à l'obscurité, idéalement dans des délais compatibles avec une analyse le jour même au
172 laboratoire. En cas d'impossibilité, la durée maximale de transport doit rester compatible avec le délai maximal
173 d'analyse recommandé (48 h) ou le délai maximal d'analyse acceptable (72 h - circonstances exceptionnelles). Seuls
174 les échantillons fixés dès le prélèvement peuvent être analysés au-delà de 24 h après le prélèvement.

175 8. Mode opératoire

176 8.1. Préparation de l'échantillon

177 Les différentes étapes distinguées ci-dessous sont présentées selon un ordre chronologique qui s'applique aux
178 échantillons depuis la réception jusqu'à la conservation du reliquat d'échantillon.

179 i. Délai de mise en analyse :

180 Les échantillons réceptionnés au laboratoire ne doivent pas avoir fait l'objet de dégradation (échauffement,
181 fuite/casse, agitation excessive, ...) pendant le transport. Afin de réduire l'impact des potentiels phénomènes de lyse
182 de cyanobactéries qui peuvent intervenir rapidement, l'analyse doit débiter le plus tôt possible après prélèvement..
183 Idéalement, il convient que l'analyse soit réalisée le jour du prélèvement voire dans les 24 h. En cas d'impossibilité,
184 la durée maximale recommandée de conservation des échantillons avant analyse, (y compris le transport) est de
185 48 h mais uniquement si l'échantillon a été fixé au lugol alcalin dès le prélèvement. Dans ces conditions de fixation,
186 le délai de mise en analyse peut exceptionnellement (circonstances non récurrentes et imprévisibles) être porté à
187 une durée de 72 h.

189 ii. Contrôles à réception et conservation des échantillons au laboratoire.

191 Un mauvais conditionnement des échantillons (proximité avec des plaques eutectiques dans les enceintes
192 isothermes de transport) peut amener à ce que l'échantillon présente visuellement des signes de congélation
193 partielle. Dans ce cas de figure, l'échantillon ne pourra être analysé.

194 Le laboratoire doit obtenir du préleveur deux fractions de l'échantillon de volume équivalent, l'une étant fixée au lugol
195 alcalin sur le terrain, l'autre non (échantillon frais). En cas d'absence de transmission d'échantillon fixé au lugol, si la
196 réception intervient dans un délai inférieur à 24 h après le prélèvement, il convient dès réception au laboratoire de
197 fixer systématiquement une partie de l'échantillon frais préalablement homogénéisé (idéalement 100 ml) avec du
198 lugol alcalin (concentration finale de 0,5% - Vol/Vol - 8 gouttes pour 100 ml). Après une légère homogénéisation du
199 flacon, l'échantillon fixé doit prendre une coloration orangée (proche de la couleur d'un thé). Si la réception de
200 l'échantillon frais intervient au-delà de 24 h, l'échantillon ne peut être analysé.

201 *Note :* Le lugol peut altérer certaines caractéristiques utiles à l'identification (couleur, structure coloniale, forme). Une attention
202 particulière doit être portée au respect de la quantité de lugol ajoutée car une concentration excessive (>1% vol/vol)
203 peut entraîner une déformation des cellules de cyanobactéries ou provoquer une coloration trop marquée préjudiciable
204 à l'étape d'identification.

205 Ponctuellement la mise en analyse d'un échantillon peut être différée par rapport à la réception. Dans ce cas, au
206 laboratoire, il convient de conserver les échantillons frais à $5^{\circ}\text{C}+/-3^{\circ}\text{C}$ et à l'obscurité sans dépasser le délai de 24 h
207 pour réaliser une observation qualitative. Dans l'attente de procéder au dénombrement, les échantillons fixés ne
208 nécessitent pas d'être réfrigérés mais devront être conservés à l'obscurité, préservés des fortes variations de
209 température et analysés prioritairement dans les 24 h voire dans les 48 h si le délai de réception au laboratoire le
210 justifie (> 24 h). Après analyse le reliquat de l'échantillon fixé est conservé dans les mêmes conditions pendant un
211 délai d'1 mois.

**212 iii. Homogénéisation de l'échantillon.**

213 Avant de procéder à l'homogénéisation s'assurer que le flacon de prélèvement est rempli à environ 80% de sa
214 capacité et qu'il existe par conséquent un espace suffisant pour permettre une agitation efficace. Agiter l'échantillon
215 en réalisant une vingtaine de mouvements en huit avec le poignet. Une agitation trop intense est susceptible de
216 dégrader certaines cellules ou colonies de cyanobactéries. La méthode d'agitation doit être clairement définie au sein
217 du laboratoire pour qu'elle soit reproductible d'un opérateur à un autre.

218 *Note :* Des phénomènes de stratification peuvent intervenir rapidement, il est donc indispensable que les prises d'essais
219 nécessaires à l'analyse soient prélevées immédiatement après une phase d'homogénéisation de l'échantillon.

220 iv. Pré-observation.

221 L'étape de pré-observation ne s'applique pas aux eaux de consommation humaine. Pour les autres types d'eaux
222 couverts par le domaine d'application de cette méthode, elle est utile pour estimer le niveau de concentration en
223 cyanobactéries et en déduire le volume d'échantillon (ou le niveau de dilution) le plus adapté pour réaliser le
224 dénombrement. Elle permet également d'identifier les échantillons les plus contaminés pour un traitement prioritaire.

225 Cette pré-observation est réalisée en microscopie droite à partir de 50 µl d'échantillon fixé, homogénéisé et déposé
226 dans une cellule de Nageotte. L'observation est réalisée au grossissement x40 ou x100 pour permettre la
227 visualisation de colonies ou filaments sur l'ensemble de la cellule de Nageotte. Après le remplissage de la cellule de
228 Nageotte il convient d'attendre une dizaine de minutes pour permettre la sédimentation des cyanobactéries (si
229 besoin ajouter du lugol pour favoriser cette sédimentation). En parallèle une observation entre lame et lamelle d'une
230 fraction de l'échantillon frais peut être réalisée à un grossissement supérieur ou égal à x400 pour identifier les
231 principaux genres présents.

232 Si on observe moins de 2 à 3 individus de cyanobactéries par bande, l'échantillon doit être concentré par filtration sur
233 une membrane en polycarbonate blanche de 3 µm de porosité. Si le volume total de la cellule de Nageotte (40
234 bandes), renferme au moins 100 individus de cyanobactéries, le dénombrement des cellules peut être effectué
235 directement à partir de cette prise d'essai en utilisant un grossissement d'au moins x400.

236 v. Modalités de filtration.

237 Dans le cas de contrôle de présence de cyanobactéries dans les eaux potables, la filtration doit être réalisée sur
238 1 litre. Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de loisirs, ou des ressources superficielles, le volume
239 d'échantillon soumis à filtration n'excèdera pas 25 ml et ne pourra être inférieur à 1 ml. En cas de doute sur le
240 volume le plus approprié, il est utile de filtrer des volumes croissants d'échantillons afin de choisir celui conduisant à
241 la densité de cellules la plus favorable lors de l'observation d'une fraction du concentrat en cellule de
242 Nageotte : répartition indépendante des microalgues, absence d'agrégation ou d'entassement.

243 Filtrer le volume d'échantillon sur une membrane en polycarbonate blanche de 3 µm de porosité² et d'un diamètre de
244 47 mm. Mettre en place l'ensemble du matériel de filtration (poste de filtration, cône, membrane, système de
245 dépression n'excédant pas 700 mbar, ...) : le robinet de vide étant fermé, placer sur le disque poreux de la base de
246 filtration une membrane filtrante en la saisissant par les bords extérieurs à l'aide d'une pince à bords plats puis
247 positionner l'entonnoir. Immédiatement après l'homogénéisation, déposer en une seule fois entre 1 et 25 ml de
248 l'échantillon soit à l'aide d'une pipette automatique (volume < 5 ml) soit à l'aide d'un pipeteur automatique et d'une
249 pipette graduée (5 ml <vol< 25 ml). Une ouverture d'au moins 3 mm de diamètre est nécessaire. Une fois la prise
250 d'essai transférée, mettre en dépression et réaliser la filtration sous vide jusqu'à l'aspiration complète de l'échantillon.
251 Rincer l'entonnoir de filtration et la membrane avec environ 10 ml d'eau déminéralisée. Couper l'aspiration puis
252 déposer la membrane dans une boîte de Petri de 55 mm de diamètre à l'aide d'une pince à bords plats.

² Dans le cas des eaux de consommation qui sont facilement filtrables des membranes de porosité inférieure à 3 µm peuvent être utilisées.

**253 vi. Transfert du concentrat dans une cellule de Nageotte :**

254 Avec une pipette automatique ajouter 1 ml d'eau déminéralisée directement sur le filtre et remettre en suspension
255 par frottement (grattoir ou doigt ganté), le matériel biologique retenu en surface. Avec la pipette automatique,
256 homogénéiser le concentrat ainsi obtenu par quelques cycles d'aspiration refoulement d'intensité modérée.
257 Transférer immédiatement une prise d'essai permettant d'obtenir un volume de 50 µl de concentrat dans la cellule de
258 Nageotte. Pour ce faire introduire l'échantillon par les goulottes prévues à cet effet après avoir déposé la lamelle
259 optiquement plane maintenue par la pression du doigt. Prévoir un cône de filtration avec une ouverture d'au moins
260 3 mm de diamètre pour s'assurer que les individus de grande taille ne seront pas exclus. Après le remplissage de la
261 cellule de Nageotte il convient d'attendre une dizaine de minutes pour permettre la sédimentation des
262 cyanobactéries.

263 *Note : De sorte à limiter les phénomènes d'agglutination des micro-algues entre elles et à réduire l'évaporation, transférer le*
264 *concentrat dans la chambre de comptage dès que possible.*

265 8.2. Dénombrement et identification des cyanobactéries :**266 i. Modalités générales d'observation**

267 La méthode n'est pas adaptée au dénombrement de l'ensemble des picocyanobactéries (< 2 µm) mais permet
268 cependant la prise en compte des individus coloniaux de cyanobactéries composés de cellules de petites tailles (ex :
269 *Aphanocapsa, Cyanogranis, Cyanodictyon, ...*).

270 L'échantillon à l'état frais peut être utilisé pour une observation qualitative.

271 Le dénombrement des cellules de cyanobactéries nécessite de transférer ensuite 50 µl d'échantillon fixé au lugol
272 alcalin dans la cellule de Nageotte et d'attendre 10 min avant de réaliser les déterminations.

273 Certaines cyanobactéries contiennent des pseudovacuoles gorgées de gaz rendant leur sédimentation difficile y
274 compris en présence de lugol. Pour cette raison l'observation dans la cellule de Nageotte doit être faite sur
275 l'ensemble de la hauteur d'eau en faisant des allers et retours avec la visse micrométrique. L'observation initiale de
276 la prise d'essai au grossissement x40 permet de visualiser rapidement la présence de cellules non sédimentées.
277 Pour visualiser les bandes de la cellule de Nageotte et les cyanobactéries restées en surface, il est nécessaire
278 d'abaisser le condenseur du microscope et de réduire l'intensité lumineuse de l'éclairage.

279 Concernant le quadrillage de la cellule de Nageotte, une règle doit être déterminée par le laboratoire pour décrire le
280 dénombrement des cellules qui se situent à l'intersection des bordures définissant les bandes. Il peut s'agir par
281 exemple de prendre en compte les cellules se situant sur les bordures supérieures et d'ignorer celles se situant sur
282 les bordures inférieures. Dans le cadre d'individus dont les cellules recouvrent plusieurs bandes, seules les cellules
283 localisées dans les bandes en cours de comptage sont intégrées au dénombrement.

284 Afin de réduire l'incertitude liée au dénombrement à un niveau acceptable, au moins 100 individus de cyanobactéries
285 doivent être dénombrés. Le dénombrement des individus est amené à dépassé régulièrement ce seuil de
286 100 individus car toute bande de la cellule de Nageotte commencée doit être prise en compte dans sa totalité. Le
287 nombre de cellules associées aux individus dénombrés doit être déterminé afin d'exprimer le résultat sous forme
288 d'une concentration en cellules/ml (ou en cellules/l dans le cas des eaux de consommation). Parallèlement
289 l'identification au genre doit être réalisée.

290 Idéalement le dénombrement des cellules qui composent les individus doit être conduit à un grossissement d'au
291 moins x400. Certains microscopes ne permettent pas d'observer avec des objectifs classiques de x40. Dans ce cas
292 de figure, il convient d'utiliser des objectifs x50 à courte distance focale (type métallurgie).

293 Si l'échantillon est fortement concentré en cyanobactéries, il convient de dénombrer un minimum de 2 bandes de la
294 cellule de Nageotte ou de diluer l'échantillon. A l'inverse, en dessous d'un nombre moyen de 2 à 3 individus de
295 cyanobactéries par bande dans la cellule de Nageotte, il est nécessaire de concentrer l'échantillon par filtration afin
296 d'atteindre sans difficulté le dénombrement d'au moins 100 individus.



297

298 **ii. Vérification du caractère aléatoire de la répartition :**

299 A faible grossissement (x40 ou x100) vérifier que les cyanobactéries sont aléatoirement distribuées dans le volume
300 de la cellule de Nageotte. Dans le cas contraire une nouvelle prise d'essai doit être réalisée à partir du concentrat.

301 *Note :* La notion de distribution aléatoire des particules est caractérisée par une répartition homogène sur l'ensemble de la
302 cellule de Nageotte en particulier pour le genre ou l'espèce dominant.

303 **iii. Comptage des cellules de cyanobactéries et identification au genre**

304

305 - Dénombrement :

306 Une première observation est réalisée afin de repérer les genres en les identifiant au mieux (grossissement x40 ou
307 x100). En cas de doute, observer parallèlement l'échantillon entre lame et lamelle classiques à un grossissement
308 supérieur (entre x400 et x1 000). Recenser les genres et identifier celui qui semble majoritaire. Dans une seconde
309 étape, dénombrer à partir d'un grossissement d'au moins x400 les individus de cyanobactéries jusqu'à atteindre au
310 moins 100 individus (toute bande commencée doit être terminée). Si au terme de cette phase de dénombrement,
311 certains genres mis en évidence initialement au grossissement x40 ou x100 ne sont pas représentés, il convient
312 alors d'accroître le nombre d'individus à dénombrer en augmentant le nombre de bandes observées.

313 *Note :* Il convient d'être particulièrement vigilant sur ce point car il est rappelé à titre d'exemple, qu'une seule colonie de
314 *Microcystis sp.* de 1 000 cellules dans la cellule de Nageotte (50 µL) correspond sur un échantillon non concentré à
315 20 000 cellules par ml.

316 En cas d'échantillons faiblement concentrés, si malgré la filtration du volume maximal d'analyse (25 ml sauf pour les
317 eaux de consommation – 1 L), les 40 bandes de la cellule de Nageotte renferment moins de 100 individus de
318 cyanobactéries, la concentration sera estimée à partir du nombre total d'individus observés sur l'ensemble de la
319 cellule de Nageotte.

320 Le nombre de cellules associées aux individus de cyanobactéries est déterminé au cas par cas à fort grossissement
321 (au moins x400) : Pour les individus de grande taille (filamenteux ou non) il est possible de définir le nombre de
322 cellules dans une portion de l'objet, puis d'extrapoler le nombre total de cellules à partir d'une estimation de la taille
323 globale de l'objet (par exemple en faisant des paquets de 10 à 50 cellules). Pour les individus de cyanobactéries
324 sous forme de filaments, le nombre total de cellules peut aussi être déterminé à partir de la longueur totale du
325 filament divisée par la longueur moyenne d'une cellule.

326 *Note :* Si un genre de cyanobactéries est présent en quantité importante et si la taille des individus au sein de ce genre
327 semble relativement homogène, il est également possible de déterminer une évaluation du nombre moyen de cellules
328 par individu à fort grossissement (typiquement x400). Ce nombre doit être déterminé sur un nombre représentatif
329 d'individus (au moins 10).

330 - Identification :

331 Des éléments en lien avec les stratégies d'identification du phytoplancton sont fournis dans la norme NF EN 15 204
332 (annexe D « identification »). Son contenu s'applique sans réserve à l'identification plus restreinte des
333 cyanobactéries. L'identification des cyanobactéries doit impérativement s'appuyer sur les ouvrages de référence
334 existants en privilégiant les plus adaptés à la zone géographique d'origine de l'échantillon. Une base de données
335 d'images numériques élaborée par le laboratoire peut être utilisée en complément des ouvrages de référence mais
336 ne peut suffire à elle seule. Par ailleurs, il convient de réaliser et d'archiver des photos des cyanobactéries amenant
337 un doute quant à leur identification afin de pouvoir les soumettre à un expert du domaine. L'identification des
338 cyanobactéries nécessite souvent d'utiliser le grossissement x600 (voire x1 000) pour observer les critères requis ce
339 qui implique une observation entre lame et lamelle classiques en plus de l'observation en cellule de Nageotte. La
340 fiabilité de l'identification et du dénombrement cellulaire des colonies de cyanobactéries formées par des cellules de
341 petite taille (ex : *Aphanocapsa*, *Cyanogranis*, *Cyanodictyon*, ...) est nettement améliorée si des grossissements
342 supérieurs à x400 sont utilisés.



343 Les critères d'identification peuvent parfois être altérés : la cohésion de certains genres coloniaux peut être réduite
344 par la fixation au lugol et/ou une agitation trop vigoureuse de l'échantillon. Par exemple, le genre *Woronochinia* est
345 susceptible de libérer des cellules isolées, tandis que le genre *Aphanizomemon* peut présenter des fragments de
346 filament dissocié.

347 **8.3. Nettoyage du matériel et conservation des échantillons après analyse :**

348 Entre deux comptages le matériel de filtration et d'observation doit être nettoyé avec un détergent adapté ou de
349 l'alcool modifié. Il doit ensuite faire l'objet d'un rinçage terminal dans de l'eau déminéralisée, puis être séché.

350 Les échantillons non fixés ne doivent pas être conservés au-delà de 24 H après le prélèvement. Après l'analyse
351 initiale, le reliquat des échantillons fixés au lugol alcalin (concentration finale de 0,5% vol/vol) doit être conservé
352 pendant un délai d'un mois (à l'obscurité) et peut être utilisé pour une ré-analyse notamment dans le cadre d'une
353 levée de doute qui concernerait le premier résultat de dénombrement et/ou d'identification.

354 *Note :* La parfaite étanchéité du flaconnage utilisé pour le conditionnement des échantillons fixés est un point essentiel pour
355 éviter les pertes en lugol par évaporation et pour maintenir des conditions de préservation optimales pour l'échantillon.

356 **9. Calculs, Expression des résultats, Rapport d'essai**

357 En se basant sur le nombre de bandes de la cellule de Nageotte prises en compte pour le dénombrement, le volume
358 associé à une bande, le volume total de la cellule de Nageotte, et la prise d'essai d'échantillon (avec ou sans
359 filtration), le nombre de cellules de cyanobactéries par unité de volume de l'échantillon peut être déterminé.

360 Pour les eaux de loisirs, et les ressources superficielles utilisées pour produire des eaux de consommation humaine
361 le dénombrement des cyanobactéries est exprimé en nombre total de cellules par ml d'échantillon.

362 Pour les eaux destinées à la consommation humaine, le dénombrement des cyanobactéries est exprimé en nombre
363 total de cellules par litre.

364 Le détail de la répartition des cyanobactéries en fonction des principaux genres doit être mentionné. Si possible et
365 uniquement en cas d'absence de tout doute quant à l'identification, déterminer l'espèce majoritaire.

366 **10. Assurance qualité**

367 Le laboratoire doit disposer d'un système qualité permettant de s'assurer que le matériel, les réactifs et les
368 techniques sont adaptés à l'essai. Ce système doit notamment permettre l'enregistrement des phases de calibration
369 du matériel, et les modalités de gestion et de contrôle des réactifs utilisés. La traçabilité mise en place doit permettre
370 d'enregistrer l'ensemble des informations nécessaires à la détermination de la concentration en cellules et à
371 l'identification des genres de cyanobactéries.

372 Le laboratoire doit constituer une photothèque de référence, mise à jour en continu et intégrant *a minima* les
373 principaux genres de cyanobactéries rencontrées dans le cadre de son activité. Cette photothèque doit être tenue à
374 disposition du personnel susceptible de réaliser des identifications et doit être consultable par des intervenants
375 extérieurs notamment dans le cadre d'audit.

376 L'étape d'homogénéisation des échantillons, l'étape de préparation des sous-échantillons, l'évaluation de la
377 répétabilité, de la reproductibilité et du niveau d'incertitude de la méthode mise en œuvre par le laboratoire pour
378 conduire les dénombrements, doivent faire l'objet d'une validation préalablement à l'utilisation de cette dernière. La
379 norme NF EN 15 204 apporte des éléments sur les critères d'évaluation et de validation de la méthode en ce qui
380 concerne l'étape de concentration par sédimentation et l'étape d'observation microscopique.