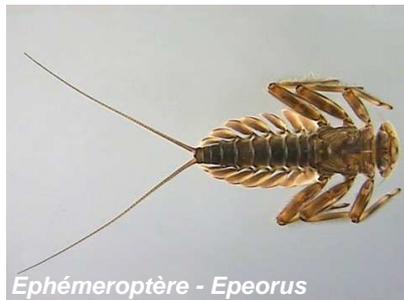


Méthode biologique fondée sur les invertébrés Pratique du tri faunistique



Source : PERLA (DIREN Auvergne)

Utilisation de la méthode de flottaison au sucre

Les hydrobiologistes des DIREN jouent un rôle actif dans la mise au point des méthodes utilisées pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques. En s'appuyant sur leur pratique de terrain et en laboratoire, ils participent à la définition et à l'expérimentation de ces méthodes et à la préparation des normes qui les encadrent. Ils s'attachent par ailleurs à en améliorer les techniques de mise en œuvre, voire innover.

Ainsi, le laboratoire de la DIREN Ile-de-France propose cette méthode de flottaison à l'aide d'une solution sucrée, destinée à faciliter le tri des invertébrés. Mentionnée dans le guide technique de l'Indice Biologique Global Normalisé, cette méthode, pratiquée depuis plus de trente ans par le laboratoire de la DIREN Ile-de-France, reste pourtant peu répandue malgré sa réelle efficacité.

C'est pourquoi nous avons jugé important de diffuser notre expérience au travers de cette brochure technique.

*Le directeur régional de l'environnement,
délégué de bassin Seine-Normandie*



Louis HUBERT

SOMMAIRE

A. Avant-propos	3
1. Historique	3
2. La méthode de flottaison au sucre : dans quel contexte ?	3
B. Considérations sur l'importance du tri	4
1. Nécessité du tri.....	4
2. Obligation d'efficacité du tri	4
C. Présentation de la méthode de flottaison	5
1. Réactifs	5
2. Matériel.....	5
3. Méthode de flottaison au sucre	6
a. Prétraitement.....	6
b. Méthode proprement dite	7
c. Fin de l'opération	8
D. Tri	9
1. Composition des bocaux et incidence sur la pratique du tri	9
2. Tri particulier du bocal D.....	10
a. Séparation des débris	10
b. Récupération des gastéropodes et des trichoptères.....	10
c. Vérification du sable	10
E. Conclusion	11

A. AVANT-PROPOS

1) Historique

L'appréciation de la qualité des milieux aquatiques peut se faire à l'aide de méthodes biologiques utilisant les invertébrés comme support. Ces méthodes sont appliquées en Ile-de-France depuis 1971, d'abord par le Service Régional d'Aménagement des Eaux (SRAE) et aujourd'hui par la DIREN.

Les hydrobiologistes de ces services ont toujours joué un rôle actif dans la mise au point des méthodes utilisées (normalisation de l'Indice Biologique Global (IBGN) et contribution à l'élaboration d'un guide technique) et continuent leur action en participant actuellement à l'élaboration du nouvel indice Invertébrés compatible avec les exigences de la Directive Cadre sur l'Eau.

Dans le cadre de ces activités, ils se sont préoccupés notamment de perfectionner la méthode de tri par flottaison de R.O. Anderson (1959)*, dont une application de cette technique avait fait l'objet d'une note diffusée par le SRAE Midi-Pyrénées (1975). Testée à l'époque par le SRAE Ile-de-France, son principe est tout de suite apparu comme très séduisant. Cependant, ses performances plutôt médiocres limitaient son emploi aux dépistages rapides.

Cette méthode ne s'est avérée satisfaisante et applicable aux méthodes biologiques standardisées qu'après plusieurs modifications faites par les hydrobiologistes d'Ile-de-France. Elle a alors été complètement adoptée et est toujours en vigueur à la DIREN Ile-de-France, ainsi que dans d'autres DIREN.

Le présent document rapporte les détails de cette méthode au sucre ; il s'agit d'une réactualisation de la précédente brochure technique éditée en janvier 1998 par la DIREN Ile-de-France.

2) La méthode de flottaison au sucre : dans quel contexte ?

La notion de tri s'entend au sens large et comporte toutes les opérations comprises entre la fin du prélèvement et la détermination des taxons. Le tri peut commencer dès le terrain lorsque, par exemple, des éléments grossiers comme les pierres sont éliminés. La présente méthode s'intéresse à la phase de tri en laboratoire.

Le principe du tri repose sur un séquençage basé sur la taille (tamisage) et la densité des éléments. Ceux-ci sont séparés selon leur densité en différentes fractions soit par lavage à l'eau (décantation, vitesse de sédimentation) soit par écrémage à l'aide d'une solution sucrée de densité appropriée. L'utilisation de cette solution sucrée permet de séparer l'échantillon en deux fractions : une partie peu volumineuse, très riche en faune mais facile à trier et une autre volumineuse, mais très pauvre en faune et donc rapide à trier.

Cette technique s'applique lorsque la méthode demande un inventaire exhaustif de la faune contenue dans l'échantillon. Elle se justifie lorsque le volume de l'échantillon est important et comporte beaucoup d'éléments fins : c'est le cas lorsque les 8 prélèvements de l'IBGN sont regroupés en 1 seul bocal, ou lorsque les 12 prélèvements de l'Indice Biologique Global compatible avec le Directive Cadre sur l'Eau (dit indice « IBG-DCE ») sont regroupés en 3 bocaux.

Bien évidemment elle ne peut s'appliquer lorsque le protocole de tri interdit la fragmentation de l'échantillon (limitation du temps de tri ; méthode AQUEM ; etc.).

* R.O. Anderson (1959) : A modified flotation technique for sorting bottom fauna samples - Limnol. Océanogr., 4,2 : 223 - 225.

B. CONSIDERATIONS SUR L'IMPORTANCE DU TRI

1. Nécessité du tri

Contrairement à d'autres méthodes biologiques (poissons, végétaux, diatomées, etc.), celles qui sont fondées sur l'identification des invertébrés benthiques nécessitent d'extraire la faune du substrat avec lequel elle est mélangée dans l'échantillon.

De plus, la diversité et l'abondance des divers organismes contraignent l'opérateur à les répartir, au jugé, en catégories provisoires avant d'être identifiés.

Ces opérations de tri font partie du protocole de la méthode au même titre que le prélèvement.

2. Obligation d'efficacité du tri

Le calcul des indices biologiques fondés sur les invertébrés repose, pour la plupart des méthodes, sur la prise en compte de la totalité de la faune contenue dans l'échantillon. Or, l'expérience montre que :

- les taxons pour lesquels peu d'individus sont dénombrés représentent généralement la majorité de la liste faunistique,
- les taxons les plus sensibles sont, pour des raisons évidentes, souvent eux-mêmes peu représentés,
- de plus, beaucoup d'individus sont petits et/ou ont recours au mimétisme ou à l'homochromie.

L'efficacité du tri peut donc avoir une incidence non négligeable sur l'évaluation de certaines métriques (diversité, abondance, taxons indicateurs, etc.) et, par voie de conséquence, sur la valeur des notes indicielles obtenues. Seule une technique de tri performante contribue à assurer une bonne fiabilité des méthodes biologiques fondées sur l'identification des invertébrés (reproductibilité, etc.)

L'extraction des invertébrés pour obtenir une liste faunistique exhaustive est une opération longue et fastidieuse. Il est donc naturel qu'on ait cherché des procédés visant à l'alléger. Généralement, l'échantillon est fractionné à l'aide d'une colonne de trois ou quatre tamis. Les refus de certains tamis peuvent eux-mêmes être divisés en deux parties (ou plus), soit par lavage, soit directement dans le tamis (technique qui pourrait s'apparenter à celle d'un chercheur d'or).

La méthode présentée dans cette note technique parachève ces pratiques et contribue ainsi à améliorer l'efficacité du tri.

C. PRESENTATION DE LA METHODE DE FLOTTAISON

1. Réactifs

Une solution de formol est utilisée pour le prétraitement des échantillons au moment du prélèvement sur site (fixation des invertébrés) composée de :

- 1 volume de formol (solution de formaldéhyde à environ 35 à 40%) ;
- 1 cuillère à soupe de carbonate de calcium ;
- 2 à 3 spatules de colorant vital : rose bengale (environ 0.5 g/l) ;
- 9 volumes d'eau du robinet.

Pour la technique de flottaison, sont utilisés :

- un sirop de sucre : dissoudre approximativement 1 kg de sucre dans 450 ml d'eau. Porter à ébullition pour dissoudre (environ 10 min si la plaque chauffante est réglée sur 300°C), et le retirer dès que l'ébullition commence (éviter de faire du caramel !).
- une solution sucrée réalisée à partir d'une dilution du sirop de sucre, d'une densité de 1,15 environ.

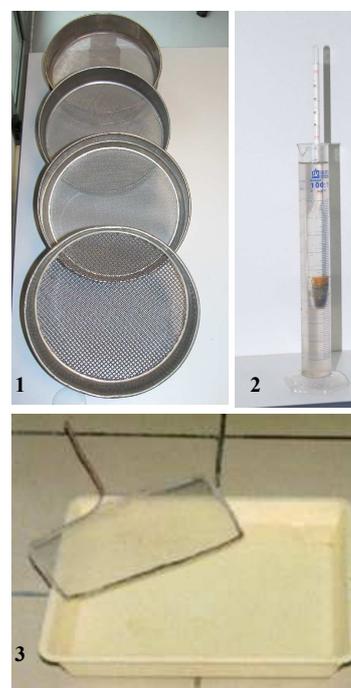
Astuce :

L'ajout de quelques cristaux de Thymol cristallisé pur dans la solution sucrée permet de limiter le développement bactérien.

2. Matériel

La mise en œuvre de cette méthode nécessite le matériel suivant :

- un jeu de quatre tamis de maille : 5 mm, 1 mm, 0.5 mm et 0.315 mm ;
- un densimètre (1 à 1.2) ;
- deux cuvettes à dissection h = 10 cm environ ;
- une bassine aux dimensions des tamis ;
- une cuvette de tri ;
- une épauvette façonnée à la dimension des cuvettes à dissection : elle peut être réalisée avec un grillage plastique type filet surber (0.5 mm) collé ou cousu sur du fil électrique (2.5 mm). Le léger biseau de sa forme en trapèze permet, en position inclinée, de s'adapter aux bords de la cuvette ;
- instruments d'optique (loupe binoculaire, etc.) ;
- petit matériel (piluliers, pinces, spatules, etc.).



(1) tamis ; (2) densimètre ;
(3) épauvette et cuvette à dissection

Source photos : DIREN Ile-de-France

3. Méthode de flottaison au sucre

a) Prétraitement

L'échantillon est fixé, lors de son prélèvement sur le terrain, par adjonction de la solution de formol qui fait également office de conservateur. La concentration finale de l'échantillon doit être approximativement de 3 à 4% en formaldéhyde.

De retour au laboratoire, un tamisage de l'échantillon sur une colonne de deux tamis de maille 5 mm (T1) et 0.5 mm (T2) permet d'obtenir :

- dans T1, les éléments grossiers (pierres, végétaux, etc.) ainsi que les invertébrés de grande taille qui sont récupérés dans un bocal = **Bocal A**.

Pour bien séparer les éléments grossiers des plus fins, ce tamis est agité dans une bassine remplie d'eau. Celle-ci est ensuite vidée dans le tamis T2.

Pour être efficace, cette opération doit être répétée plusieurs fois jusqu'à obtention d'une eau claire.



Source photo : DIREN Ile-de-France

Agitation du tamis dans une bassine d'eau.

- dans T2, les éléments plus fins dont le diamètre est compris entre 0.5 et 5mm.

➔ **Le contenu de T2 fait l'objet de la méthode de flottaison au sucre.**

b) Méthode proprement dite

L'opération s'effectue à l'aide de deux cuvettes à dissection (C1 et C2) disposées côte à côte.

- Vérifier que la densité de la solution sucrée est proche de 1.15 à l'aide d'un densimètre (cf. §1 pour la préparation). Ajuster si besoin avec le sirop de sucre.
- Le contenu de T2 doit être bien égoutté afin de ne pas diluer la solution sucrée pendant la suite des opérations.



Egouttage de T2

- Déposer le contenu de T2 dans une cuvette (C1) avec le moins d'eau possible (photo 1), puis verser dans cette cuvette la solution sucrée jusqu'à, environ, 0.5 cm du rebord.

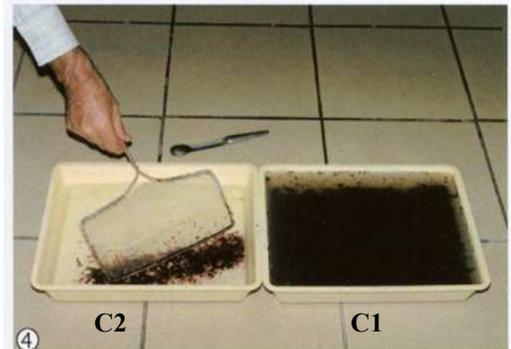
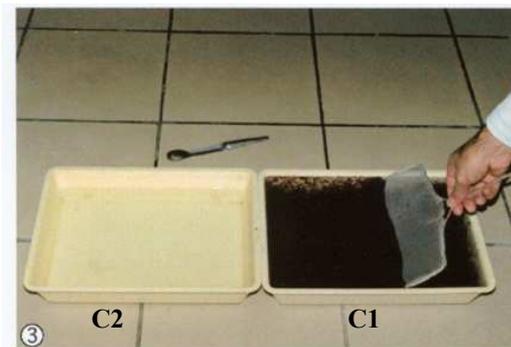
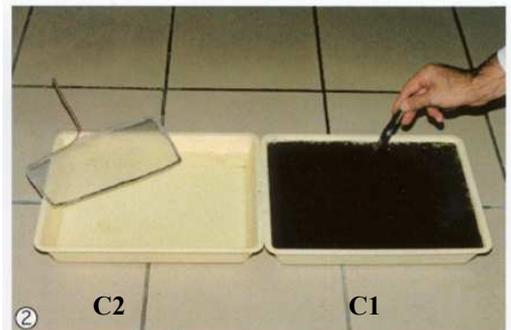
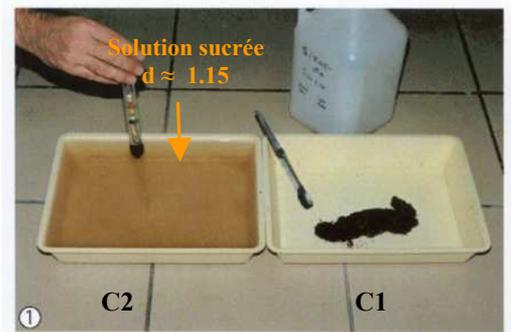
- Délayer très soigneusement avec une spatule (photo 2).

- Attendre 2 à 3 minutes et récupérer le surnageant avec l'épuisette (photo 3), le déposer dans la cuvette (C2) remplie aux trois quarts d'eau (photo 4).



Zoom sur l'écrémage

→ Renouveler l'opération « homogénéisation-attente-écrémage », mais en attendant moins longtemps, jusqu'à l'obtention d'une surface propre (généralement 3 à 4 fois).



Source photos : DIREN Ile-de-France

Illustration des 4 étapes de la flottaison au sucre.

c) Fin de l'opération

Tamisage du contenu de la cuvette d'eau (C2) sur une colonne de tamis de mailles 1 mm et 0.5 mm (cf. photo) :

- le tamis de 1 mm est agité dans une bassine d'eau pour garder les éléments supérieurs à 1 mm. Le contenu du tamis constitue le **bocal B**.
- le contenu de la bassine est versé sur le tamis de maille 0.5 mm.
- le tamis de maille 0.5 mm est également agité dans la bassine d'eau pour éliminer les éléments inférieurs à 0.5 mm. Le contenu de ce tamis constitue le **bocal C**.

Le contenu de la cuvette C1 est filtré avec un tamis fin (maille 0.315 mm) dans la cuvette C2 (cf. photo), ce qui permet de récupérer la solution sucrée (celle-ci est réutilisée pour l'échantillon suivant après avoir été ajustée). Le contenu du tamis constitue le **Bocal D**.

Les quatre bocaux sont triés immédiatement ou peuvent être stockés avec un peu d'eau formolée ou d'alcool en vue d'un tri ultérieur (cf. photo).



Tamisage de C2 sur une colonne de tamis 1 mm et 0.5 mm.



Filtration de C1 : solution de sucre contenant les éléments non flottants de l'échantillon.



Source photos : DIREN Ile-de-France

D. TRI

1. Composition des bocaux et incidence sur la pratique du tri.

A : végétaux ; pierres ; invertébrés de grande taille. Bien que le volume soit souvent important, le tri est généralement rapide.

B : débris végétaux et invertébrés. En principe le volume est restreint mais c'est le bocal qui contient la majeure partie de la faune. Contrairement à l'idée reçue, cette fraction, pour que la méthode soit pleinement efficace, doit contenir une certaine quantité de débris (plus de 50%). Autrement dit, la solution sucrée doit être suffisamment concentrée (les valeurs de densité généralement préconisées dans d'autres méthodes sont nettement trop faibles). Le tri, relativement long, consiste essentiellement à répartir chacun des taxons présumés dans des piluliers.

C : représente la fraction des éléments fins, permet de compléter B2 auquel il est semblable. Le tri s'effectue obligatoirement à l'aide d'instruments d'optique. Long à la binoculaire, il peut être rendu assez rapide par l'utilisation de fortes loupes.



Instruments d'optiques : lunettes grossissantes, loupes sur serre tête et sur pied.

D : volume important de sable et de débris, où se trouvent encore certains invertébrés (oligochètes, trichoptères à fourreaux, gastéropodes). Contrairement à la croyance, ce bocal doit impérativement être trié (cf. § suivant).



Illustrations des fractions séparées après tamisage.

Source photos : DIREN Ile-de-France

→ Le contenu de chacun des quatre bocaux peut être trié suivant la technique favorite de l'opérateur, cependant le bocal D mérite une mention spéciale.

2. Tri particulier du bocal D

→ Principe : le contenu du bocal D est lavé à plusieurs eaux, chaque eau de lavage étant versée dans la cuvette de tri.

Mode opératoire :

a) Séparation des débris

Remplir le bocal au robinet et mettre ses éléments en suspension. Laisser décanter et verser une partie de l'eau (environ 2/3) dans la cuvette de tri lorsque cette eau semble « triable » (relativement peu de particules en suspension). La cuvette, outre de nombreuses particules végétales, peut contenir des oligochètes (en majorité) et des nématodes. Les autres invertébrés sont rares.

Répéter cette opération, en laissant décanter de moins en moins longtemps, jusqu'à l'obtention d'une eau claire.

Le tri, parfois assez long, demande une attention moins soutenue que pour les autres bocaux. Les invertébrés sont peu nombreux et le colorant rouge les rend particulièrement visibles.

b) Récupération des gastéropodes et des trichoptères

A ce stade ne remplir le bocal qu'au tiers et imprimer un vif mouvement circulaire pour remettre en suspension (vortex).



Illustration de la mise en suspension (vortex)

Vider, sans décanter, l'eau dans la cuvette en entraînant une petite partie du sable. C'est un tour de main difficile à acquérir : la tendance naturelle est de ne pas agir assez rapidement (il ne faut pas plus d'une seconde) et de ne pas vider la bonne quantité (pas juste l'eau et bien sûr pas tout !). Recommencer plusieurs fois de plus en plus énergiquement cette opération de centrifugation.

Les premières cuvettes contiendront d'abord les coquilles vides, puis les gastéropodes et les trichoptères à fourreaux.

c) Vérification du sable

Après la phase de récupération des gastéropodes, ce qui reste ne contient pratiquement plus d'invertébrés (se méfier des Goeridae). Le tri, le plus souvent assez rapide, doit évidemment se poursuivre jusqu'au dernier grain de sable.



Mise en suspension du bocal : les particules sédimentent successivement selon leur densité.



Les éléments mis en suspension par le vortex sont versés dans la cuvette de tri.

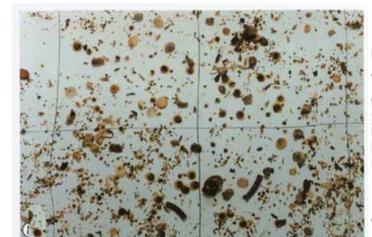


Illustration des premières cuvettes contenant les gastéropodes et trichoptères à fourreaux.

Source photos : DIREN Ile-de-France

E. CONCLUSION

La finalité première de la technique de tri par flottaison de R.O. Anderson, un peu expéditive, était de réduire de façon appréciable le temps de tri. Après plusieurs modifications destinées à l'améliorer (augmentation de la densité de la solution sucrée, diminution du temps d'attente lors de la flottaison, tri de l'ensemble des différentes fractions, etc.), le gain de temps reste réel. Cependant, le véritable point fort réside dans la qualité du tri (confort, efficacité) avec pour corollaire logique une reproductibilité consolidée de la méthode.

Précisément, cette reproductibilité est sous la dépendance de trois opérations : prélèvement, tri et détermination. Le prélèvement est standardisé et l'identification des taxons, effectuée par des spécialistes, ne pose pas de difficultés majeures. Par contre, la reproductibilité liée au tri est assujettie à l'assiduité (et à l'acuité visuelle !) de l'opérateur. Toute pratique qui contribue à l'améliorer, comme celle présentée dans cette brochure, est donc la bienvenue.

Etant données les caractéristiques avantageuses de cette technique, il est concevable de ne pas la réserver seulement à des cas particuliers, mais d'en recommander l'utilisation en routine. Le souci de s'engager dans une démarche qualité peut également justifier son emploi.



Direction régionale de l'environnement
79, rue Benoît Malon
94254 GENTILLY Cedex

Service de l'eau et des milieux aquatiques
Unité expertise de la qualité de l'eau et des milieux aquatiques
Rédacteur : Christian LALANNE-CASSOU
Avec la participation de Elise CARNET et Alban GERBAULT

© septembre 2009 – DIREN ÎLE-DE-FRANCE – Tous droits réservés
Document téléchargeable sur le site Internet de la DIREN à l'adresse suivante :
<http://www.ile-de-france.ecologie.gouv.fr/>