



INSTITUT LOUIS MALARDE
Laboratoire des Biotoxines Marines
BP30 Papeete Tahiti
98713 French Polynesia

STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) - 3

METHODE DE COLLECTE DES MACROALGUES

Version : 2.0

Date de revue: 11.07.2022

Auteurs: Dr Mireille CHINAIN & Dr Clémence GATTI

Page(s) : 3

Date de validation : 22.07.2022

Vidéo tutorielle accessible via la e-plateforme CIGUAWATCH :

<https://ciguawatch.ilm.pf/ciguatera-environmental-monitoring-methodology-2/>

1 Liste des matériels requis

- Une éprouvette graduée de 1 L
- Un tamis de porosité 200-300 μm
- Un entonnoir adapté à la taille du tamis de 200-300 μm
- Des petits carrés de fibre de nylon de porosité 20 μm , de 4 sur 4 cm
- Une unité de filtration composée d'un entonnoir de 200mL à 500mL, d'une base pour filtres de 25 mm de diamètre, un bouchon, et une fiole de filtration à tubulure latérale de 500ml à 1L
- 1 pompe à vide manuelle
- 2 paires de pinces à embout plat
- Une pissette d'eau de mer filtrée
- Des tubes coniques à bouchon vissé de 15 ml et leur portoir
- Une solution de formol commercial
- Une bouteille d'éthanol absolu
- Des pipettes plastiques de 10 mL conditionnées en emballage individuel
- Une micropipette (P1000) avec embouts jetables
- Des pasteurettes
- Un marqueur indélébile fin
- Un carnet + un stylo
- Un rouleau de parafilm

2/ Traitement des Window Screen

2.1. Filtration des échantillons

- Placer l'entonnoir et le tamis de porosité 200-300 μm au-dessus de l'éprouvette graduée de 1L
- Renverser une partie de l'échantillon sur le tamis pour créer un volume mort dans le flacon de vissé de 500mL contenant le window-screen
- Retourner le flacon plusieurs fois puis l'agiter vigoureusement durant 5-10 secondes pour décrocher les cellules du WS et disperser les amas cellulaires
- Retirer le window-screen du flacon et le jeter.

- ❑ Filtrer la totalité de l'échantillon à travers le tamis de 200-300 µm pour enlever les sédiments et débris de grande taille.
- ❑ Rincer le flacon avec la pissette d'eau de mer filtrée, puis filtrer l'eau de rinçage.
- ❑ Noter le « Volume Total de l'échantillon » indiqué sur l'éprouvette et consigner l'information dans un carnet.
- ❑ Préparer l'unité de filtration en plaçant sur la base de filtration un carré de filtre de nylon de 20 µm de porosité, puis le maintenir en place à l'aide de l'entonnoir de filtration de 200mL à 500mL.
- ❑ Brancher la pompe à main sur la fiole de filtration.
- ❑ Placer un morceau de parafilm sur l'éprouvette graduée et la retourner 2-3 fois afin de remettre les cellules en suspension, puis filtrer immédiatement la totalité de l'échantillon, en procédant par petits volumes. Appliquer une faible pression de temps en temps à l'aide de la pompe manuelle pour accélérer la filtration.
- ❑ Si seule une partie de l'échantillon est filtrée en raison d'un colmatage progressif du filtre de nylon, noter le « Volume Résiduel » indiqué sur l'éprouvette
- ❑ Noter le « Volume Filtré » qui correspond au « Volume Total de l'échantillon - Volume Résiduel » dans le carnet.
- ❑ Pour compléter la filtration, rincer les parois de l'entonnoir de filtration à l'aide d'une pissette d'eau de mer filtrée pour récupérer le matériel cellulaire résiduel sur le filtre de nylon, puis laisser l'eau de rinçage s'écouler par gravité.
- ❑ Avant de traiter l'échantillon suivant, éliminer les débris du tamis de 200-300 µm, et laver soigneusement le tamis, l'entonnoir, l'éprouvette et l'ensemble de l'unité de filtration à l'eau du robinet, puis rincer le tout à l'eau déminéralisée. Sécher à l'aide de papier absorbant.

2.2. Fixation des échantillons

- ❑ Remplir les tubes à bouchon vissé coniques avec 15mL d'eau de mer filtrée
- ❑ Retirer l'entonnoir de l'unité de filtration et saisir délicatement les bords du filtre de nylon à l'aide des pinces à bout plat, puis le plier soigneusement, cellules orientées vers l'intérieur du filtre
- ❑ Transférer immédiatement le filtre de nylon de 20 µm dans un tube vissé conique préalablement rempli d'eau de mer filtrée.
- ❑ Fermer le tube, le retourner puis le tapoter légèrement sur le dessus de la paillasse de manière à immerger complètement le filtre de nylon dans l'eau de mer.
- ❑ Secouer énergiquement le tube pour décrocher les cellules déposées sur le filtre de nylon.
- ❑ Fixer les échantillons dans du formol sous une sorbonne ou dans un espace aéré en ajoutant 600 µl d'une solution de formol dans chaque tube (soit environ 15 gouttes à l'aide d'une pasteurette).
- ❑ Annoter le tube (date, nom du site, n° échantillon, volume total de l'échantillon et volume filtré) à l'aide d'un marqueur indélébile. Prendre soin de reporter ces informations dans le carnet.
- ❑ Sceller hermétiquement les tubes avec du parafilm.
- ❑ Conserver les échantillons à température ambiante jusqu'au moment des numérations de cellules de microalgues au microscope optique.

3/ Recommandations

- ❑ Si les échantillons sont destinés à des analyses moléculaires (PCR en temps réel), fixer les échantillons dans de l'éthanol absolu au lieu du formol. Dans ce cas, remplir directement les tubes à bouchon vissé avec 15mL d'éthanol absolu (au lieu d'eau de mer) avant d'y transférer le filtre de nylon de 20 µm.
- ❑ Si les échantillons sont destinés à des analyses moléculaires, désinfecter l'ensemble du matériel (tamis, entonnoir, verrerie, pinces, etc) en les trempant dans de l'eau de javel à 10% pendant 10

mn pour éliminer tout risque de transfert d'ADN. Puis rincer le tout à l'eau déminéralisée et laisser sécher.

- ❑ L'échantillon est maintenant prêt pour le dénombrement cellulaire au microscope ou en utilisant la technique de qPCR

4/ Liste des Equipements de Protection Individuels requis

- ❑ le bateau devra être équipé de l'ensemble des équipements de sécurité règlementaires
- ❑ Il est recommandé de porter des gants de plongée lors des échantillonnages en milieu marin pour limiter les risques de piqûres ou de morsures par la faune marine