

Essai d'aptitude par comparaison Inter-analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin

**RAPPORT D'ÉVALUATION DES COMPÉTENCES DES ANALYSTES DU PHYTOPLANCTON DANS
LE CADRE DU RÉSEAU D'OBSERVATION ET DE SURVEILLANCE DU PHYTOPLANCTON ET DE
L'HYDROLOGIE (REPHY) MIS EN ŒUVRE PAR L'IFREMER
EXERCICE 2018**

N. Masson-Neaud, M. Brun

Avril 2019

Document final

Avec le soutien de

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2018, au titre de l'action « B3 » « Mettre en œuvre les méthodes de bioindication dans la surveillance et l'évaluation ».

Auteurs :

Nadine Masson-Neaud
Ifremer centre de Nantes
Nadine.Masson@ifremer.fr

Mélanie Brun
Ifremer centre de Nantes
Melanie.Brun@ifremer.fr

Vérification du document :

Béatrice Lalère
LNE
Beatrice.Lalere@lne.fr

Les correspondants

AFB : *Maïa Akopian*, *maia.akopian@afbiodiversite.fr*

IFREMER : *Rémi Buchet*, *Remi.Buchet@ifremer.fr*

Référence du document : Nadine Masson-Neaud, Mélanie Brun - Essai d'aptitude par comparaison Inter-analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin - Rapport d'évaluation des compétences des analystes du phytoplancton dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY) mis en œuvre par l'Ifremer-Exercice 2018- Rapport AQUAREF 2019 - 67 p.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

1. INTRODUCTION.....	8
2. MATERIELS ET METHODES.....	9
2.1 Organisation.....	9
2.2 Interprétation statistique des résultats quantitatifs.....	10
2.3 Vérification de l'homogénéité et de la stabilité des échantillons	11
2.4 Biais	12
3. RÉSULTATS	12
3.1 Stratégie de comptage des opérateurs.....	12
3.2 Résultats qualitatifs.....	15
3.3 Résultats des tests d'homogénéité et de stabilité.....	28
3.4 Résultats quantitatifs des participants et discussion	30
4. DISCUSSION GÉNÉRALE SUR LES RÉSULTATS	42
5. BILAN	44

Liste des annexes :

ANNEXE I Bibliographie	45
ANNEXE II Marine Institute - IPI - International Phytoplankton Intercomparison 2018 - Instructions.....	46
ANNEXE III Résultats détaillés des analystes.....	63
ANNEXE IV Résumé des z scores de tous les analystes.....	66
ANNEXE V Diffusion interne Ifremer du rapport	67

Liste des photos :

Photo 1 : <i>Dactyliosolen fragilissimus</i> échantillon IPI 2018 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)	17
Photos 2 : <i>Heterocapsa triquetra</i> échantillon IPI 2018 - photo A : A. Lejolviet (contraste de phase) photo B : A. Piraud (épifluorescence)	17
Photo 3 : <i>Amphidinium carterae</i> échantillon IPI 2018 photo A : N. Neaud Masson, photo B : A. Lejolviet (microscope optique à contraste de phase)	19
Photo 4 : <i>Thalassiosira gravida</i> échantillon IPI 2018 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase) Taille cellule Diamètre : 25 µm, épaisseur 10 µm	20
Photo 5 : <i>Pseudo-nitzschia delicatissima complex</i> échantillon IPI 2018 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase) Taille cellule Longueur : 42 µm, largeur 1,6 µm	20
Photo 6 : cellule isolée <i>Chaetoceros lorenzianus</i> échantillon IPI 2018 - photo A. Lejolviet (microscope optique à contraste de phase).....	21
Photo 7 : Chaîne de <i>Chaetoceros lorenzianus</i> échantillon IPI 2018 - photo N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)	21

Photo 8 : chaine de <i>Chaetoceros lorenzianus</i> échantillon IPI 2018 - photo N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)	21
Photo 9 : chaine de <i>Chaetoceros lorenzianus</i> échantillon IPI 2018 - photo S. Françoise (microscope optique à contraste de phase)	21
Photo 10 : <i>Karenia mikimotoi</i> échantillon IPI 2018 photos A, B : N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase) photo C : Aude Piraud (épifluorescence) Taille cellule : 44 µm.....	23
Photos 11 : <i>Levanderina fissa</i> échantillon IPI 2018 photo A : N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase) photo B : Aude Piraud (épifluorescence) taille des cellules Longueur 45 µm largeur : 35 µm	24
Photo 12 : <i>Kryptoperidinium foliaceum</i> Bassin d'Arcachon 2006 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)	24
Photo 13 : <i>Prorocentrum micans</i> échantillon IPI 2018 - photos A. Lejolivet (microscope optique à contraste de phase et épifluorescence) taille des cellules Longueur 58 µm largeur : 37 µm	26
Photo 14 : <i>Melosira nummuloides</i> échantillon IPI 2018 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)	27

ESSAI D'APTITUDE PAR COMPARAISON INTER-ANALYSTES POUR L'ÉVALUATION DES PERFORMANCES EN IDENTIFICATION ET DÉNOMBREMENT DU PHYTOPLANCTON MARIN - RAPPORT D'ÉVALUATION DES ANALYSTES DU PHYTOPLANCTON DANS LE CADRE DU RÉSEAU D'OBSERVATION ET DE SURVEILLANCE DU PHYTOPLANCTON ET DE L'HYDROLOGIE (REPHY) MIS EN ŒUVRE PAR L'IFREMER. EXERCICE 2018
N. Masson-Neaud, M. Brun.

RÉSUMÉ

La détermination des espèces phytoplanctoniques et l'estimation de leur abondance dans le cadre du Réseau d'observation et de surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie, mis en œuvre par l'Ifremer (REPHY) s'appuie en 2018, sur 25 analystes répartis sur 12 sites.

Les essais d'aptitude par comparaison inter-laboratoires ou inter-analystes sont utilisés pour évaluer les performances des laboratoires ou analystes sur des compétences spécifiques. Un exercice d'inter-comparaison international (IPI) est organisé tous les ans par le Marine Institute Phytoplankton unit de Galway (Irlande), pour évaluer les performances en identification et en dénombrement du phytoplancton marin. En 2018, neuf analystes du REPHY ont été inscrits à titre individuel pour participer à l'IPI. Les échantillons envoyés aux analystes concernés ont été utilisés pour évaluer aussi les compétences des analystes non-inscrits à l'IPI. Au total, 21 analystes sur les 25 du REPHY ont rendu leurs résultats.

Ce rapport décrit le déroulement de l'IPI et de l'essai complémentaire Ifremer (Comparaison Inter-Analystes) et présente seulement les résultats obtenus pour l'essai Ifremer. L'objectif est d'apporter des éléments à l'ensemble du personnel du REPHY afin de permettre une amélioration continue des pratiques et de déterminer des actions à mettre en œuvre pour cette amélioration.

En ce qui concerne l'identification des taxa, avec 98 % de résultats corrects et tous les genres correctement identifiés par 19 participants, l'essai confirme les compétences des analystes. Les difficultés d'identifications spécifiques concernent essentiellement les dinoflagellés. La microscopie en épifluorescence est une technique qui permet l'observation des thèques des dinoflagellés sans destruction du matériel et le passage du contraste de phase à l'épifluorescence peut se faire au fil de l'analyse, ce qui est un avantage par rapport à la dissection manuelle (destructrice) des cellules. En 2018 huit laboratoires sur les douze implantations du réseau d'observateurs du REPHY ont un microscope équipé d'un module d'épifluorescence. En 2019 tous les laboratoires de notre réseau seront équipés, à l'exception de la station de Bastia.

L'analyse statistique des résultats quantitatifs s'appuie sur le calcul du score z comme mesure de performance, tel que défini dans la norme NF ISO 13528 :2015. Concernant ces résultats, 94% des scores z sont compris entre les limites de tolérance ce qui est globalement très satisfaisant.

Mots clés (thématique et géographique) : Phytoplancton, Comparaison Inter-Laboratoire, CIL, Comparaison Inter-Analyste, CIA, Essai d'aptitude.

INTER-ANALYST COMPARISON PROFICIENCY TEST TO EVALUATE MARINE PHYTOPLANKTON IDENTIFICATION AND ENUMERATION PERFORMANCE - REPORT OF ASSESSMENT OF PHYTOPLANKTON ANALYSTS IN THE FRAMEWORK OF THE OBSERVATION AND MONITORING NETWORK FOR PHYTOPLANKTON AND HYDROLOGY IN COASTAL WATERS (REPHY) IMPLEMENTED BY IFREMER. YEAR 2018.
N. Masson-Neaud, M. Brun.

ABSTRACTS

The determination of phytoplankton species and the estimation of their abundance in the context of the Phytoplankton and Hydrology Monitoring and Surveillance Network, implemented by Ifremer (REPHY), are based in 2018 on 25 analysts spread over 12 sites.

Proficiency testing by inter-laboratory or inter-analyst comparison is used to evaluate the performance of laboratories or analysts on specific skills. An International Phytoplankton Inter-comparison (IPI) is organized annually by the Marine Institute Phytoplankton unit of Galway (Ireland), to evaluate marine phytoplankton identification and enumeration performance. The IPI is implementing its inter-comparison exercises through the Marine Institute Ireland in cooperation with the Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC) through its Science and Communication Centre on Harmful Algae at the University of Copenhagen, Denmark. The UK NE Atlantic Marine Biological Analytical Quality Control Scheme (NMBAQC) is one of their partners. In 2018, nine REPHY analysts were enrolled individually to participate in the IPI. The samples sent to the relevant analysts were used to also assess the skills of non-IPI analysts. A total of 21 on 25 REPHY analysts reported their results.

This report describes the progress of the IPI and the Ifremer complementary test (Inter-Analyst Comparison) and presents only the results obtained for the Ifremer test. The objective is to provide elements to all REPHY staff in order to maintain a continuous improvement of practices and to determine actions required for this improvement.

Regarding the identification of taxa, with 98% of correct results and all genera correctly identified by 19 participants, the test confirms the skills of the analysts. The difficulties of specific identifications mainly concern dinoflagellates. Epifluorescence microscopy is a technique that allows the observation of dinoflagellate theca without destruction of the material, and the transition from phase contrast to epifluorescence can be done during the analysis, which is an advantage over the manual dissection (destructive) of the cells. In 2018, eight laboratories out of the twelve implantations of the REPHY monitoring network have a microscope equipped with an epifluorescence module. In 2019 all the laboratories will be equipped except the Bastia station.

The statistical analysis of the quantitative results is based on the calculation of the z score as a performance measure, as defined in the ISO 13528: 2015 standard. Regarding these results, 94% of z scores are within the tolerance limits, which is overall very satisfactory.

Key words (thematic and geographical area): Phytoplankton, Inter-Laboratory Comparison, ILC, Inter-Analyst Comparison, IAC, Aptitude Test, International Phytoplankton Inter-comparison, IPI.

1. INTRODUCTION

L'Ifremer est chargé d'apporter à l'État et aux autres personnes morales de droit public son concours pour l'exercice de leurs responsabilités notamment pour le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin (Décret du 5 juin 1984 modifié).

La mise en œuvre par Ifremer d'une surveillance du phytoplancton et des phycotoxines depuis 1984 répond à cette mission, et le concours apporté à l'Administration Centrale se concrétise particulièrement en un soutien :

- au Ministère de la Transition écologique et solidaire (MTES), à l'Agence Française pour la Biodiversité (AFB) et aux Agences de l'Eau des façades littorales (AEAP, AESN, AELB, AEAG, AERMC2), pour la réponse aux Directives européennes Cadre sur l'Eau (DCE) et Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) sur les parties relatives à la surveillance de l'élément phytoplancton et des paramètres hydrologiques dans le milieu littoral ;
- à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (MAA), pour l'application de la réglementation relative au suivi de la salubrité des zones de production de coquillages, incluant la surveillance du phytoplancton toxique qui contribue à la mise en œuvre de la surveillance des phycotoxines.

L'objectif principal du REPHY est la connaissance de la biomasse, de l'abondance et de la composition du phytoplancton marin des eaux côtières et lagunaires, ainsi que du contexte hydrologique afférent. Cette connaissance recouvre notamment celle de la distribution spatio-temporelle des différentes espèces phytoplanctoniques et de leur évolution, et le recensement des efflorescences exceptionnelles. L'acquisition simultanée de paramètres hydrologiques et physico-chimiques et chimiques permet de caractériser et de comprendre les processus gouvernant les écosystèmes côtiers.

En 2018, la détermination des espèces phytoplanctoniques et l'estimation de leur abondance dans le cadre du REPHY ont été réalisées par 25 analystes de l'Ifremer, répartis sur 12 sites, plus un analyste en soutien à la coordination nationale du REPHY. Les protocoles usuellement appliqués par les analystes sont décrits dans le document de méthode de Neaud-Masson (2015). Ces protocoles s'inspirent des lignes directrices de la norme NF EN 15204 (2006) fondée sur la technique de sédimentation classique telle que définie par Utermöhl en 1958. Cette norme s'adresse spécifiquement aux analyses de routine par microscopie optique inversée, telles que pratiquées pour le REPHY, mais elle ne cite pas explicitement le recours à des exercices de comparaison inter-laboratoires (CIL) ou inter-analystes (CIA). En revanche le recours à de tels essais est introduit comme exigence relative à la qualification du personnel dans la norme NF EN 15972 (2011) et est obligatoire dans le cadre des accréditations en application de l'arrêté Agrément des opérateurs de la surveillance DCE (arrêté du 27 octobre 2011). Les CIL ou CIA sont utilisées pour évaluer les performances des laboratoires ou analystes sur des compétences spécifiques.

Deux CIL ont été organisées en interne à l'Ifremer en 2006 et 2007 (Grossel, 2007 ; 2009). Depuis 2014, les analystes du REPHY participent à l'International Phytoplankton Intercomparison (IPI) organisée tous les ans par le Marine Institute Phytoplankton unit de Galway (Irlande), en collaboration avec le Centre UNESCO de la Commission Océanographique Intergouvernementale (COI) pour la Science et la communication sur les algues nuisibles (Danemark). Le but de cet exercice international est de comparer les performances en terme d'identification et de dénombrement du phytoplancton marin, des analystes des laboratoires engagés dans les programmes nationaux officiels de surveillance du phytoplancton, dans la DCE et dans la DCSMM, ainsi que d'autres laboratoires (organismes environnementaux, consultants, entreprises privées) travaillant dans l'analyse du phytoplancton marin. A l'issue de cet essai, chaque analyste reçoit un certificat de performance. Ce document est important pour alimenter le dossier de compétence personnel de chaque analyste et satisfaire aux exigences relatives à la qualification du personnel, requises dans la norme NF EN 15972. En 2018, neuf analystes Ifremer ont été inscrits pour participer à l'IPI réalisé par le Marine Institute de Galway.

Les échantillons envoyés aux laboratoires des analystes concernés ont été utilisés pour évaluer également les compétences des analystes réalisant des analyses de phytoplancton dans le cadre du REPHY dans ces mêmes laboratoires mais non-inscrits à l'IPI. Ce CIA complémentaire a pour objectif de permettre aux analystes des laboratoires du dispositif du REPHY de d'évaluer leurs compétences vis-à-vis des résultats obtenus par l'ensemble des analystes de ce réseau. Cet exercice s'impose également pour l'évaluation des performances des observateurs et leur habilitation dans le cadre du Réseau d'observation du phytoplancton labellisé (PHYTOBS) qui regroupe les deux réseaux SOMLIT-Phyto (CNRS-Universités) et REPHY (Ifremer).

Ce rapport décrit le déroulement de l'IPI et de l'essai complémentaire concernant les analystes de l'Ifremer (CIA). Il présente les résultats obtenus pour « l'essai Ifremer » seulement. Les résultats des évaluations individuelles des participants sont discutés. Chaque participant devra tenir compte de sa propre évaluation pour mettre en œuvre les actions requises le cas échéant.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 ORGANISATION

En 2018, 9 des 25 analystes du dispositif du REPHY, répartis sur 12 sites, ont été inscrits à l'IPI et ont rendu leurs résultats selon les instructions prévues (Cf. ANNEXE II). Au total, 99 analystes de 47 laboratoires se sont inscrits à cet exercice (77% d'Europe, 10% d'Amérique du Sud, 7% d'Afrique, 5% d'Australie et Nouvelle Zélande et 1% du Moyen Orient). Les inscrits français ont représenté 10% des participants avec 9% provenant de l'Ifremer et 1% du Littoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266.

Les échantillons de cet essai ont été utilisés pour étendre l'exercice aux analystes du REPHY non inscrits à l'IPI. Douze analystes, en plus des neuf inscrits à l'IPI, ont participé et ont rendu leurs résultats. Au total 21 analystes sur les 25 qui constituent le réseau d'observation du REPHY ont donc participé à cet exercice en 2018. Quatre analystes n'ont pas participé car deux d'entre eux sont en cours d'habilitation et deux autres sont sur le point d'arrêter leur activité analytique.

Tous les échantillons ont été préparés par Le Marine Institute de Galway. En 2018, le Marine Institut a investi dans un homogénéiseur automatique de type Inversina 2L tumler mixer par Bioengineering, dans le but d'améliorer l'homogénéité des échantillons. Ce matériel est utilisé pour la préparation de la solution mère constituée d'un mélange d'espèces issues de cultures en laboratoire. Afin d'améliorer la stabilité des échantillons et de permettre ainsi d'allonger le délai de rendu des résultats, le Marine Institut a aussi modifié le conditionnement des échantillons en utilisant des ampoules en verre brun d'un volume de 5 mL. Dans chaque ampoule contenant 100 µl de lugol neutre, 3 mL exactement de la solution mère sont introduits. Puis les ampoules sont « purgées » à l'azote, scellées et conservées à une température de 2 à 5 °C à l'abri de la lumière jusqu'à l'expédition aux participants.

Les tests d'homogénéité et de stabilité ont été menés par le Marine Institut. Les résultats de ces tests ont été fournis dans le rapport de R.Salas, D. Walsh et J.Larsen (International Phytoplankton Intercomparaison (IPI) proficiency testing in the abundance and composition of marine microalgae 2018 report) qui nous a été transmis le 31 janvier 2019, sont utilisés pour interpréter les résultats du CIA.

Vers le 28 juin 2018, les participants inscrits à l'IPI ont reçu le matériel à analyser.

Les participants ont réalisé une analyse microscopique sur trois aliquotes (réplicas) et ont retourné les résultats concernant la composition des taxons présents, identifiés au niveau de l'espèce ou, à défaut, du genre, ainsi que leurs abondances en nombre de cellules par litre, pour chaque taxon, dans chaque réplica. Dans le cadre de l'IPI, les analystes avaient jusqu'au 28 septembre 2018 pour rendre leurs résultats.

Au sein de chaque laboratoire du réseau de l'Ifremer, un analyste au minimum est inscrit à l'IPI (à l'exception des analystes du site Ifremer de Sète dont le mouvement en cours de personnel les dispensait de cet exercice). Les autres analystes des laboratoires utilisent donc les échantillons reçus dans le cadre de l'IPI. Le volume de chaque aliquote (50 ml) permet la mise à décanter en cuve de deux sous échantillons. Les volumes des cuves utilisées, la date de mise à décanter ainsi

que la date d'analyse sont renseignés dans la fiche de rendu des résultats. Le délai de rendu des résultats est le même que pour l'IPI. Le traitement des résultats a été fait de manière anonyme. Pour cela, un code comprenant une lettre et un chiffre a été attribué à chaque analyste. Chaque analyste connaît son propre code et seul l'organisateur de cet essai connaît l'ensemble des correspondances analyste/code. La lettre correspond au laboratoire et le chiffre à l'analyste, mais ni l'un ni l'autre ne correspond à un ordre quelconque. L'intérêt de ce rapprochement est de visualiser les résultats au sein d'un même laboratoire et de permettre aux analystes de mener une réflexion avec les autres analystes de son laboratoire. A l'issue du traitement des résultats, chaque analyse tient compte de son évaluation pour mettre en œuvre les actions requises le cas échéant.

2.2 INTERPRÉTATION STATISTIQUE DES RÉSULTATS QUANTITATIFS

L'analyse statistique des résultats s'appuie sur la norme NF ISO 13528:2015, relative aux « Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons inter-laboratoires ». La statistique de performance utilisée pour comparer les résultats des 16 analystes, pour chaque espèce phytoplanctonique, est le score z :

$$z_{s,a} = \frac{x_{s,a} - X_s}{\hat{\sigma}_s},$$

avec :

- $z_{s,a}$ le score z de l'analyste a pour l'espèce s ;
- $x_{s,a}$ le résultat de l'analyste a pour l'espèce s ;
- X_s la valeur assignée à x pour l'espèce s ;
- $\hat{\sigma}_s$ l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude (c.-à-d. « la mesure de la dispersion utilisée dans l'évaluation des résultats d'un essai d'aptitude », ISO 13528:2015) pour l'espèce s .

La valeur assignée et l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude sont définis comme étant respectivement la moyenne et l'écart-type « robustes » des résultats des analystes pour chaque espèce phytoplanctonique. Les valeurs pour ces deux grandeurs sont calculées par la mise en œuvre de l'algorithme A décrit dans l'annexe C.3 de la norme. Pour chaque valeur assignée, l'incertitude a également été calculée selon la formule présente dans la norme NF ISO 13528:2015 :

$u(X_s) = 1.25 \times (\hat{\sigma}_s / \sqrt{p})$, avec p le nombre de participants. Si cette valeur est strictement inférieure à 30 % de $\hat{\sigma}_s$, alors l'incertitude de la valeur assignée est considérée comme négligeable, ce qui revient à dire qu'il faut au minimum 18 participants.

L'interprétation des scores z se fait de la manière suivante :

- le score z donne un « signal d'action » si sa valeur est inférieure à -3 ou supérieure à 3 (limites de contrôle) ;
- le score z donne un « signal d'avertissement » si sa valeur est inférieure à -2 ou supérieure à 2 (limites de tolérance).

Pour un analyste, la présence d'un « signal d'action » dans un cycle d'essais ou de deux « signaux d'avertissement » dans deux cycles successifs prouve l'existence d'une anomalie nécessitant des recherches pour comprendre et résoudre la source de l'anomalie. La justification de cette interprétation, c'est-à-dire des seuils ± 2 et ± 3 , repose sur l'hypothèse d'une distribution normale des valeurs x , ce qui n'est pas le cas des données de comptage de flores phytoplanctoniques. En revanche, elles sont supposées être distribuées selon une loi Log-Normale. Une transformation logarithmique de base 10 a donc été appliquée aux données brutes de comptage, pour les trois répliques, afin de satisfaire à l'hypothèse de normalité. Les valeurs de

référence X_s et $\hat{\sigma}_s$, ainsi que les scores z ont été calculés à partir de la moyenne, sur les trois répliques, des données transformées.

2.3 VÉRIFICATION DE L'HOMOGENÉITÉ ET DE LA STABILITÉ DES ÉCHANTILLONS

En se basant sur la norme NF ISO 13528:2015, trois critères d'homogénéité ont été calculés à partir des données transformées (log10).

- L'écart-type inter-échantillons s_s , calculé tel que décrit dans la norme NF ISO 13528:2015 Annexe B, est comparé à l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude $\hat{\sigma}_s$. Si $s_s \leq 0.3 \times \hat{\sigma}_s$, alors la variance inter-échantillons ne contribue pas à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation de l'aptitude et les échantillons peuvent être considérés comme homogènes.
- Le critère étendu, qui prend en compte également la variabilité intra-échantillons, est utilisé pour tenir compte de l'erreur d'échantillonnage et de la répétabilité réelle lors de l'essai d'homogénéité.
- Une analyse de variance (F-test), basée uniquement sur les résultats issus du test d'homogénéité, est également réalisée afin d'identifier s'il y a une différence ou non de résultat entre les échantillons.

Selon la norme NF ISO 13528:2015, il est indiqué que si les critères d'homogénéité suffisante ne sont pas satisfaits, il faut inclure l'écart-type inter-échantillons dans l'écart-type pour

l'évaluation de l'aptitude, tel que $\hat{\sigma}'_s = \sqrt{(\hat{\sigma}_s)^2 + (s_s)^2}$.

De même, deux critères de stabilité ont été calculés :

- La différence absolue entre les moyennes des résultats des tests d'homogénéité ($\bar{X}_{hom.}$) et de stabilité ($\bar{X}_{stab.}$) est comparée à l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude $\hat{\sigma}_s$. Si $|\bar{X}_{hom.} - \bar{X}_{stab.}| \leq 0.3 \times \hat{\sigma}_s$, alors les échantillons sont considérés comme stables.
- Le critère peut également être élargi en prenant en compte les incertitudes des grandeurs $\bar{X}_{hom.}$ et $\bar{X}_{stab.}$.

2.4 BIAIS

Dans la norme NF ISO 13528:2015, il est indiqué que lorsque la valeur assignée est estimée à partir des résultats des participants et qu'une estimation indépendante fiable est disponible, soit dans notre cas la moyenne obtenue dans le cadre des tests d'homogénéité, les deux valeurs doivent être comparées. Pour cela, il est nécessaire de calculer l'incertitude type de la différence d'après la formule :

$$u(X_{ref} - X_s) = \sqrt{u^2(X_{ref}) + u^2(X_s)} ,$$

avec :

- $u(X_{ref})$ l'incertitude de la valeur de référence ;
- $u(X_s)$ l'incertitude de la valeur assignée.

Si la différence entre la valeur de référence et la valeur assignée est supérieure à deux fois $u(X_{ref} - X_s)$, il est nécessaire d'en chercher la cause. Selon la norme et dans le cas présent, les causes possibles sont :

- biais dans la méthode de mesure de référence ;
- biais commun dans les résultats des participants.

3. RÉSULTATS

3.1 STRATÉGIE DE COMPTAGE DES OPÉRATEURS

Le tableau suivant résume les conditions analytiques en détaillant les délais des comptages et les volumes des cuves utilisées par chaque analyste.

Pour les analystes inscrits à l'IPI international, les codes sous soulignés.

Le délai "récep/décant." est l'écart en nombre de jours entre la date de réception et la mise à décanter de l'échantillon et le délai "décant/anal." correspond au nombre de jours entre la préparation des cuves et l'analyse.

Tableau 1 : Déroulement des analyses par codes laboratoires et analystes – Délais en nombre de jours
(les codes des analystes ayant participé à l'IPi sont en italique-soulignés)

CODE Labo- Analyst	1er réplica					2ème réplica					3ème réplica				
	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai récep/décant (Nb jours)	délai décant/anal (Nb jour)	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai récep/décant (Nb jours)	délai décant/anal (Nb jour)	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai récep/décant (Nb jours)	délai décant/anal (Nb jour)
<u>A-33</u>	25	28/08/2018	30/08/2018	62	2	25	28/08/2018	31/08/2018	63	3	25	28/08/2018	31/08/2018	63	3
A-8	20	28/09/2018	03/10/2018	95	5	25	28/08/2018	21/09/2018	83	23	20	15/10/2018	19/10/2018	111	4
A-9	25	28/08/2018	29/08/2018	61	1	25	28/08/2018	29/08/2018	61	1	25	28/08/2018	29/08/2018	61	1
<u>B-71</u>	25	18/07/2018	20/07/2018	22	2	25	18/07/2018	26/07/2018	28	8	25	18/07/2018	26/07/2018	28	8
B-10	25	18/07/2018	19/07/2018	21	1	25	18/07/2018	19/07/2018	21	1	25	18/07/2018	19/07/2018	21	1
B-4	25	18/07/2018	27/07/2018	29	9	25	18/07/2018	26/07/2018	28	8	25	18/07/2018	26/07/2018	28	8
<u>C-93</u>	10	25/07/2018	26/07/2018	28	1	10	26/07/2018	27/07/2018	29	1	10	27/07/2018	30/07/2018	32	3
C-17	10	28/08/2018	29/08/2018	61	1	10	28/08/2018	30/08/2018	62	2	10	30/08/2018	31/08/2018	63	1
<u>D-22</u>	25	10/07/2018	12/07/2018	14	2	25	16/07/2018	19/07/2018	21	3	25	25/07/2018	26/07/2018	28	1
D-13	25	10/07/2018	18/07/2018	20	8	25	16/07/2018	23/07/2018	25	7	25	25/07/2018	01/08/2018	33	6
<u>E-58</u>	20	09/09/2018	11/09/2018	73	2	20	09/09/2018	12/09/2018	74	3	20	12/09/2018	13/09/2018	75	1
E-1	20	09/09/2018	13/09/2018	75	4	20	09/09/2018	11/09/2018	73	2	20	09/09/2018	11/09/2018	73	2
E-18	20	09/09/2018	10/09/2018	72	1	20	12/09/2018	14/09/2018	76	2	20	09/09/2018	11/09/2018	73	2
<u>F-56</u>	25	10/09/2018	17/09/2018	79	7	25	10/09/2018	18/09/2018	80	8	25	10/09/2018	20/09/2018	82	10
F-15	25	10/09/2018	17/09/2018	79	7	25	10/09/2018	03/10/2018	95	23	25	10/09/2018	24/09/2018	86	14
<u>G-61</u>	10	13/09/2018	14/09/2018	76	1	10	18/09/2018	20/09/2018	82	2	10	20/09/2018	21/09/2018	83	1
<u>H-75</u>	25	27/08/2018	28/08/2018	60	1	25	27/08/2018	28/08/2018	60	1	25	27/08/2018	28/08/2018	60	1
H-5	25	26/09/2018	27/09/2018	89	1	25	27/08/2018	06/09/2018	68	9	25	08/10/2018	09/10/2018	101	1
I-11	20	26/09/2018	27/09/2018	89	1	20	11/10/2018	15/10/2018	107	4	20	09/10/2018	10/10/2018	102	1
<u>J-77</u>	25	27/08/2018	28/08/2018	60	1	25	05/09/2018	06/09/2018	68	1	25	06/09/2018	07/09/2018	69	1
J-14											25	06/09/2018	13/09/2018	75	7

Dans les instructions de l'IPI (cf. ANNEXE II), il est conseillé d'utiliser des cuves d'un volume de 25 ml si possible, afin de diminuer au mieux l'incertitude sur la mesure. La majorité des participants a utilisé des cuves de 20 ou 25 ml. Seuls les analystes **G-61**, **C-17** et **C-93** ont utilisé des cuves de 10 ml.

Concernant les délais d'analyse, deux durées sont à prendre en considération : (i) le délai entre la réception des échantillons et la préparation des cuves à décanter ; (ii) le délai entre la préparation des cuves et l'analyse au microscope. Ces délais apportent des informations sur les causes possibles d'une éventuelle dégradation des échantillons. Pour assurer une bonne conservation des échantillons, les recommandations de la norme NF EN 15204 (2006) sont les suivantes : « Il convient de stocker les échantillons conservés avec la solution de lugol à l'obscurité et de les refroidir de 1°C à 5°C, à moins qu'ils soient analysés sous trois semaines, auquel cas il est possible de les stocker à température ambiante ».

Cette année, le conditionnement des échantillons fournis par le Marine Institut a évolué de manière à assurer une meilleure stabilité dans le temps. Précédemment les échantillons étaient prêts à l'emploi, c'est à dire prêt à être directement transférés dans les cuves à décanter. Cette année ils étaient conditionnés en ampoules en verre brun stériles. Ainsi, la stabilité des échantillons a été testée par le Marine institut qui assure une conservation pendant une longue période (au moins un an) sans dégradation. **De ce fait, le délai entre la réception des échantillons et l'analyse ne devrait pas impacter les résultats. En revanche, les délais entre la préparation des cuves et l'analyse, peut avoir un impact car une fois les échantillons préparés et mis à décanter, la stabilité n'est plus assurée.**

A noter que l'analyste **J-14** n'a rendu de résultats de dénombrement que pour un seul réplica au lieu de trois attendus, ces résultats ne sont pas intégrés dans l'évaluation quantitative. Toutefois, l'analyste est évalué sur ses résultats qualitatifs.

3.2 RÉSULTATS QUALITATIFS

Composition spécifique de référence

Comme stipulé dans le rapport final de l'IPI, les échantillons comprenaient les dix espèces suivantes :

- Dactyliosolen fragilissimus* (Bergon) Hasle, 1996
- Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein, 1883
- Amphidinium carterae* Hulburt, 1957
- Thalassiosira gravida* Cleve 1896 (syn. : *Thalassiosira rotula* Meunier 1910)
- Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (*Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in Heiden & Kolbe 1928)
- Chaetoceros lorenzianus* Grunow, 1863
- Karenia mikimotoi* (Miyake & Kominami ex Oda) Gert Hansen & Ø.Moestrup, 2000
- Gymnodinium/Gyrodinium* sp. (*Gyrodinium instriatum* Freudenthal & J.J.Lee, 1963
synonyme de *Levanderina fissa* (Levander) Ø.Moestrup, P.Hakanen, G.Hansen, N.Daugbjerg & M.Ellegaard, 2014)
- Prorocentrum micans* Ehrenberg, 1834
- Melosira nummuloides* C.Agardh 1824

Résultats qualitatifs des participants

Une liste fermée d'espèces est proposée pour le rendu des résultats. Ceci présente des inconvénients, car cette liste réduite peut être interprétée comme une aide à l'identification des espèces et constituer un biais par rapport à la méthode. Cette liste peut également présenter des « pièges » avec plusieurs réponses correctes pour le même taxon (e.g. synonymes, groupement de taxons). L'utilisation de ce format de rendu des résultats permet en revanche une meilleure lisibilité des résultats des participants : les erreurs de transcription sont évitées et aucune interprétation n'est nécessaire car il empêche les identifications comme par exemple « dinoflagellé non identifié », « diatomée centrique » ou « dinoflagellé nu ».

Le tableau suivant présente les identifications taxinomiques de chaque analyste. Pour les analystes inscrits à l'IPI international, les codes sont soulignés. Les identifications attendues sont indiquées en têtes de colonnes. La case est colorée en vert lorsque l'identification au niveau attendu est correcte (espèce, groupe d'espèces ou groupe de genre pour *Gymnodinium/Gyrodinium*), en bleu lorsque l'identification est correcte au niveau du genre et en rouge lorsque l'identification est incorrecte au niveau du genre.

Tableau 2 : Résultats qualitatifs par analyste – Taxa identifiés

Code Lab-analyst	<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	<i>Heterocapasa triquetra</i>	<i>Amphidinium carterae</i>	<i>Thalassiosira rotula/gravida</i>	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima complex</i>	<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	<i>Karenia mikimotoi</i>	<i>Levanderina fissa</i> <i>Gyrodinium instriatum</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Melosira nummuloides</i>	<i>Ceratoneis closterium</i>
<u>A-33</u>						<i>C. lorenzianus</i> <i>C. decipiens</i>					
A-8						<i>C. decipiens</i>					
A-9						<i>C. lorenzianus</i> <i>C. decipiens</i>					
B-10	<i>Dactyliosolen sp.</i>	<i>Heterocapasa sp.</i>	<i>Amphidinium sp.</i>	<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>Chaetoceros sp. (Hyalochates)</i>		<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>		<i>Melosira sp.</i>	
B-4				<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>C. decipiens</i>		<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>		<i>Melosira sp.</i>	
<u>B-71</u>				<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>C. decipiens</i>		<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>			
C-17						<i>C. decipiens</i>	<i>Karlodinium micrum</i>	<i>Gymnodinium sp.</i>			
<u>C-93</u>			<i>Amphidinium sp.</i>	<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>C. decipiens</i>	<i>Gymnodinium sp.</i>				
D-13						<i>C. decipiens</i>		<i>Gymnodinium sp.</i>			<i>Ceratoneis closterium</i>
<u>D-22</u>				<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>C. decipiens</i>		<i>Gymnodinium sp.</i>			<i>Ceratoneis closterium</i>
E-1				<i>Thalassiosira sp.</i>				<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>			
E-18				<i>Thalassiosira sp.</i>				<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>			
<u>E-58</u>				<i>Thalassiosira sp.</i>				<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>			
F-15						<i>Chaetoceros sp. (Hyalochates)</i> <i>C. decipiens</i>					
<u>F-56</u>						<i>Chaetoceros sp. (Hyalochates)</i> <i>C. lorenzianus</i> <i>C. Decipiens</i>					
<u>G-61</u>						<i>Chaetoceros sp. (Hyalochates)</i> <i>C. decipiens</i>		<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>		<i>Melosira sp.</i>	
H-5	<i>Dactyliosolen sp.</i>		<i>Amphidinium sp.</i>	<i>Thalassiosira sp.</i>	<i>Pseudo-nitzschia sp.</i>	<i>Chaetoceros sp. (Hyalochates)</i>	<i>Karenia brevis</i>	<i>Glenodinium foliaceum</i>		<i>Melosira sp.</i>	
<u>H-75</u>						<i>C. decipiens</i>		<i>Gymnodinium sp.</i>			
I-11	<i>Dactyliosolen sp.</i>		<i>Amphidinium sp.</i>	<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>C. ceratosporus</i>		<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>		<i>Melosira sp.</i>	
J-14				<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>Chaetoceros sp. (Hyalochates)</i>					
<u>J-77</u>				<i>Thalassiosira sp.</i>		<i>Chaetoceros sp. (Hyalochates)</i>					

Légende

	Espèce ou groupe d'espèces correct	150 cases vertes / 210	71%
	Genre correct	56 cases bleues / 210	27%
	Genre incorrect ou non observé	4 cases rouges / 210	2%
	Analyste inscrit à l'IPI (Galway)		

71% des identifications sont correctes au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces. Les identifications correctes au niveau des genres ou espèces cumulées représentent 98 % des résultats.

Dactyliosolen fragilissimus (Bergon) Hasle, 1996

L'espèce *Dactyliosolen fragilissimus* a été identifiée par 18 analystes sur les 21. Trois analystes n'ont identifié que le genre.

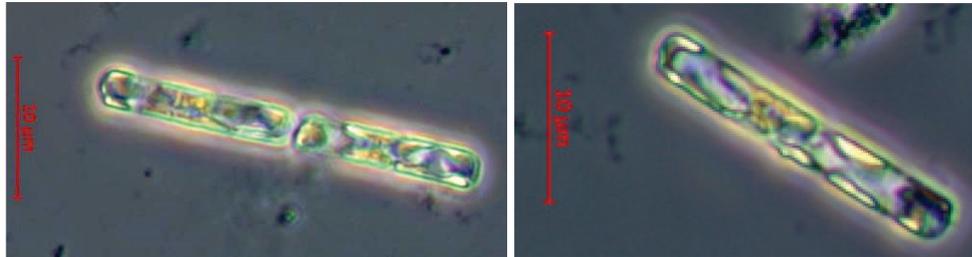


Photo 1 : *Dactyliosolen fragilissimus* échantillon IPI 2018 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase).

Cellules cylindriques plus longues que larges, aux extrémités arrondies, réunies entre elles par une faible partie centrale de la valve pour former de courtes chaînes droites. Valves faiblement convexes avec une petite épine oblique près du centre de la face de la valve. Nombreux petits chloroplastes.

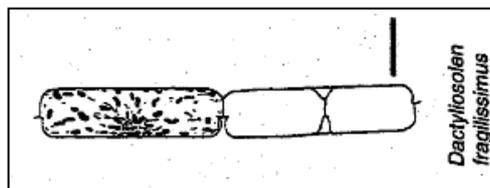
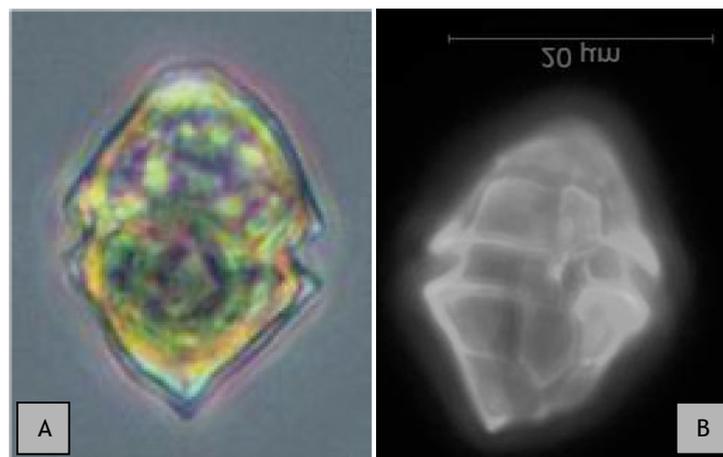


Figure 1 : Planches *Dactyliosolen fragilissimus* (scale bar = 20 μ m)
in Tomas C. (Editor) 1997. Identifying Marine Phytoplankton. ISBN-13 978-0-12-693018-4. ISBN-10 0-12-693018-X

Heterocapsa triquetra (Ehrenberg) Stein, 1883

20 analystes ont correctement identifié l'espèce *Heterocapsa triquetra* et un analyste s'est arrêté au genre *Heterocapsa*.



Photos 2 : *Heterocapsa triquetra* échantillon IPI 2018 -
photo A : A. Lejolviet (contraste de phase)
photo B : A. Piraud (épifluorescence)

Cellules petites et fusiformes à contour irrégulier, dissymétrique selon les axes principaux. Épithèque conique plus ou moins tronquée à l'apex ; hypothèque conique terminée par une corne excentrée, parfois rudimentaire. Cingulum équatorial à sub-équatorial légèrement descendant. Sulcus assez large court et peu creux. Chloroplastes présents. Noyau positionné dans l'épithèque et le pirenioïde dans l'hypothèque.

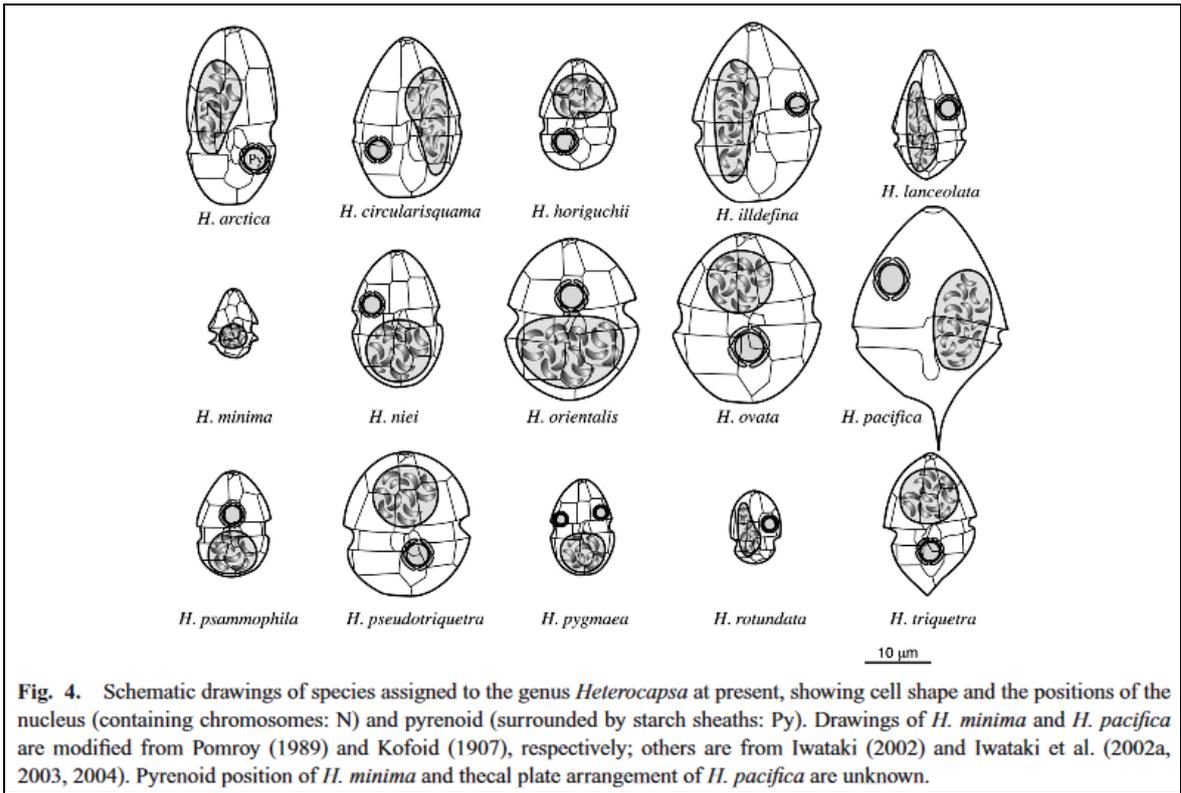


Fig. 4. Schematic drawings of species assigned to the genus *Heterocapsa* at present, showing cell shape and the positions of the nucleus (containing chromosomes: N) and pyrenoid (surrounded by starch sheaths: Py). Drawings of *H. minima* and *H. pacifica* are modified from Pomroy (1989) and Kofoid (1907), respectively; others are from Iwataki (2002) and Iwataki et al. (2002a, 2003, 2004). Pyrenoid position of *H. minima* and thecal plate arrangement of *H. pacifica* are unknown.

Figure 2 : Planche extraite de Mitsunori Iwataki (2008). Taxonomy and identification of the armored dinoflagellate genus *Heterocapsa* (Peridinales, Dinophyceae)

Selon Mitsunori Iwataki les positions du noyau et du pyrénôïde sont stables selon les espèces d'*Heterocapsa*, et, combinés à la forme des cellules, constituent des critères utiles pour différencier certaines espèces

Amphidinium carterae Hulburt, 1957

17 analystes ont correctement identifié l'espèce *Amphidinium carterae* et quatre analystes se sont arrêtés au genre *Amphidinium*.

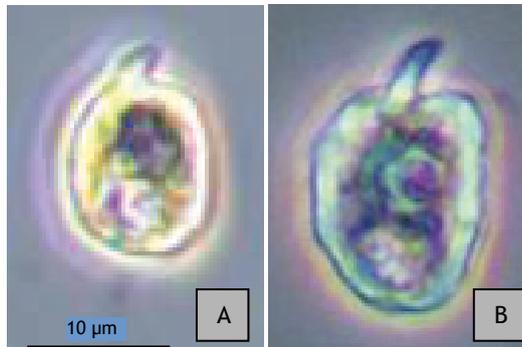


Photo 3 : *Amphidinium carterae* échantillon IPI 2018
photo A : N. Neaud Masson, photo B : A. Lejollivet (microscope optique à contraste de phase)

Petite cellule ovoïde en vue ventrale, aplatie dorso-ventralement. Cingulum très antérieur. Épicône réduit, asymétrique et courbé vers la gauche. Hypocone elliptique avec le bord droit légèrement convexe, et le bord gauche plutôt droit. Noyau situé dans la partie inférieure de l'hypocone. Pyrénoloïde présent au centre de l'hypocone.

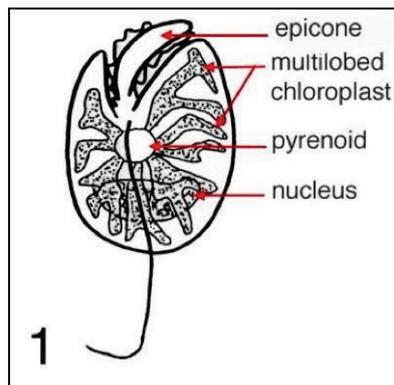


Figure 3 : source <https://alchetron.com/cdn/amphidinium-7beb3bb7-311e-42f6-8c69-67ac012b664-resize-750.jpeg>



Amphidinium carterae
Description Culture from the Roscoff Culture Collection
Author [Vaulot, Daniel](#)

Thalassiosira gravida Cleve 1896 (syn. : *Thalassiosira rotula* Meunier 1910)

Neuf des analystes ont correctement identifié ce taxon au niveau de l'espèce, et 12 se sont arrêtés au genre. À noter que cette espèce était également présente dans les échantillons de l'exercice de 2016.

Le taxon proposé dans la grille de réponse est *Thalassiosira rotula/gravida* car *T. rotula* est actuellement considéré comme synonyme de *T. gravida*¹. Mais cela reste incertain selon le Worms. Quoi qu'il en soit, ces deux espèces très proches morphologiquement, ne peuvent pas être distinguées par microscopie optique photonique².



Photo 4 : *Thalassiosira gravida* échantillon IPI 2018 -
photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)
Taille cellule Diamètre : 25 µm, épaisseur 10 µm

Bien que dans les échantillons il n'y avait pas ou peu de chaînes, certaines cellules isolées possédaient encore le filament de liaison des cellules. L'épaisseur de ce filament bien visible qui relie en chaîne droite les cellules, ainsi que la forme rectangulaire des cellules en vue connective représentent des caractéristiques typiques de *T. gravida*.

Pseudo-nitzschia delicatissima complex (*Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in Heiden & Kolbe 1928)

Le groupe *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex a été correctement identifié par 20 analystes. Un analyste s'est arrêté au genre.

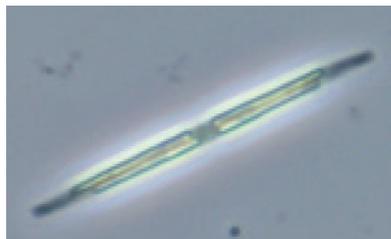


Photo 5 : *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex échantillon IPI 2018 -
photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)
Taille cellule Longueur : 42 µm, largeur 1,6 µm

¹ Sar, E.A., Sunesen, I., Lavigne, A.S. & Lofeudo, S. (2011). *Thalassiosira rotula*, a heterotypic synonym of *Thalassiosira gravida*: morphological evidence. *Diatom Research* 26(1): 109-119.

² Bérard-Therriault, L., Poulin, M., et Bossé, L. 1999. Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires. *Publ. spéc. can. sci. halieut. aquat.* 128. 387 p.

Chaetoceros lorenzianus Grunow, 1863

Les cellules de cette espèce présentes dans les échantillons ont posé des difficultés aux analystes. Présentes principalement en cellules isolées avec quelques rares voire pas de chaîne, les analystes ont souvent pensé être en présence de 2 ou 3 espèces distinctes. Selon le Marine Institut une seule espèce a été introduite et concerne *Chaetoceros lorenzianus*. Une majorité d'analystes (13) a identifié *C. decipiens*, trois analystes ont détecté *C. lorenzianus* en plus de *C. decipiens* et sept d'analyste ont choisi le sous-genre *Chaetoceros* (*Hyalochaete*).

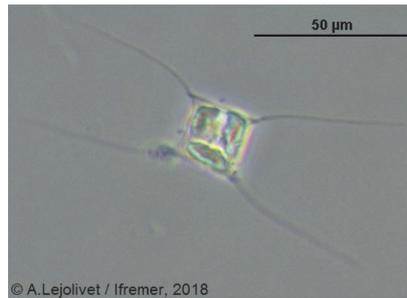


Photo 6 : cellule isolée *Chaetoceros lorenzianus* échantillon IPI 2018 - photo A. Lejolviet (microscope optique à contraste de phase).

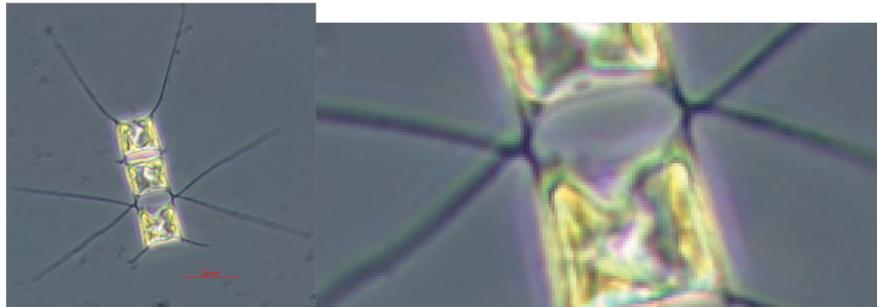


Photo 7 : Chaîne de *Chaetoceros lorenzianus* échantillon IPI 2018 - photo N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase).



Photo 8 : chaîne de *Chaetoceros lorenzianus* échantillon IPI 2018 - photo N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase).

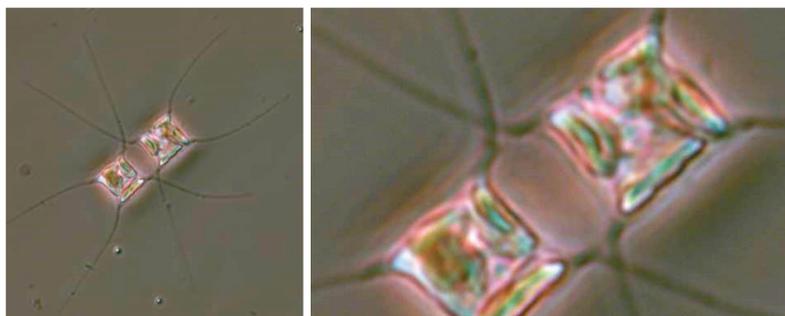


Photo 9 : chaîne de *Chaetoceros lorenzianus* échantillon IPI 2018 - photo S. Française (microscope optique à contraste de phase).

Ce qui caractérise *C. decipiens* est le point de fusion des soies à la base qui est nettement marqué, ce qui paraît être nettement le cas sur la photo 6 et son zoom. Alors que sur la photo 7 et son zoom, on distingue un vide à la base des soies qui indique que les deux soies se croisent mais ne sont pas fusionnées et sur la photo 8 c'est encore plus évident.

Sur les trois photos, les soies terminales divergent sans devenir parallèles à l'axe de la chaîne ce qui exclut aussi *C. decipiens* (cf. Tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des caractères morphologiques de *C. decipiens* et *C. lorenzianus*

	<i>C. decipiens</i>	<i>C. lorenzianus</i>
Chaîne	courtes, droites, raides et aplaties, réunissant jusqu'à 18 cellules	chaînes courtes, droites et raides, et réunissant une dizaine de cellules
chloroplastes	Plusieurs	Plusieurs
Fenêtre	étroite et lancéolée	largement elliptique à ovale
Soies intercalaires	Soies intercalaires soudées par paires sur une distance égale à plusieurs fois la largeur d'une soie, au-delà de la marge de la chaîne, puis devenant divergentes	Soies intercalaires droites et raides, fusionnées seulement à leur point de sortie à la marge, puis se croisant à angle aigu, peu ou pas recourbées vers les extrémités de la chaîne
Soies terminales	Soies terminales plus fortes, légèrement divergentes puis parallèles à l'axe de la chaîne.	Soies terminales plus courtes, plus fortes et divergentes.
Taille des cellules	Diamètre : 23-80 µm Axe perivalvaire : 23-36 µm	Diamètre : 14-41 µm Axe perivalvaire : 21-60 µm

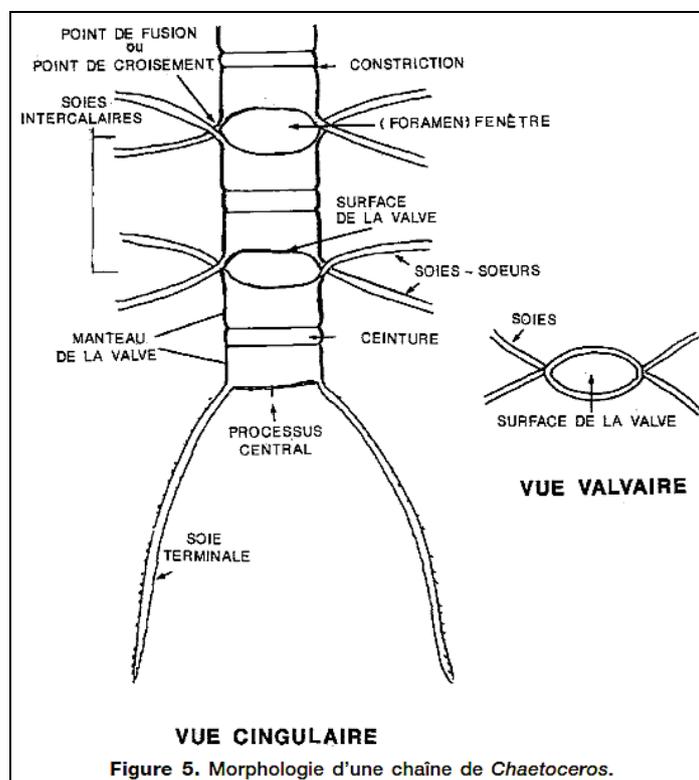


Figure 5. Morphologie d'une chaîne de *Chaetoceros*.

Figure 4 : Terminologie descriptive des *Chaetoceros* in Bérard-Therriault, L., Poulin, M., et Bossé, L. 1999. Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires. Publ. spéc. can. sci. halieut. aquat. 128. 387 p.

Karenia mikimotoi (Miyake & Kominami ex Oda) Gert Hansen & Ø.Moestrup, 2000

L'espèce *Karenia mikimotoi* a été correctement identifiée par 18 analystes, un analyste a identifié le même genre en choisissant *K. brevis* et deux analystes n'ont pas identifié le bon genre en choisissant *Karlodinium micrum* ou *Gymnodinium* sp. Tous ces taxons font partie des dinoflagellés nu et leur distinction est très difficile. Les genres se différencient par la forme de leur sillone apicale (cf. Figure 5 Forme de l'acrobase) très difficile à observer au microscope optique à contraste de phase.

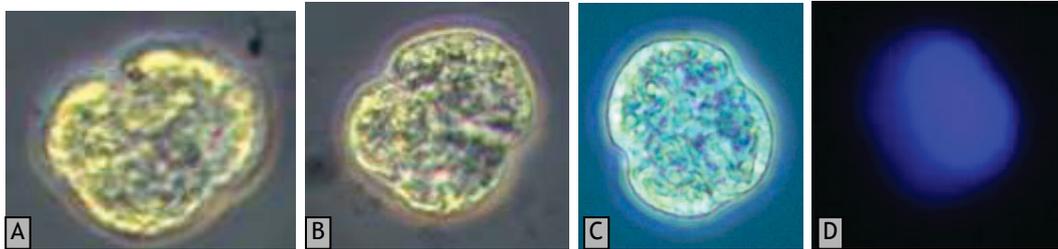


Photo 10 : *Karenia mikimotoi* échantillon IPI 2018
 photos A, B : N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)
 photo C : Aude Piraud (épifluorescence)
 Taille cellule : 44 µm

En faisant tourner les cellules, il était possible d'observer que celle ci était aplaties dorso-ventralement ce qui est caractéristique de *Karenia mikimotoi*.

La photo D permet de visualiser le noyau de la cellule de la photo C, celui ci est de forme ellipsoïde et situé dans la partie gauche de la cellule ce qui est bien le cas chez *K. mikimotoi*.

Karenia brevis pouvait être écarté en raison de la forme de son épicone qui présente une nette protubérance à l'apex, absente sur les cellules de l'exercice.

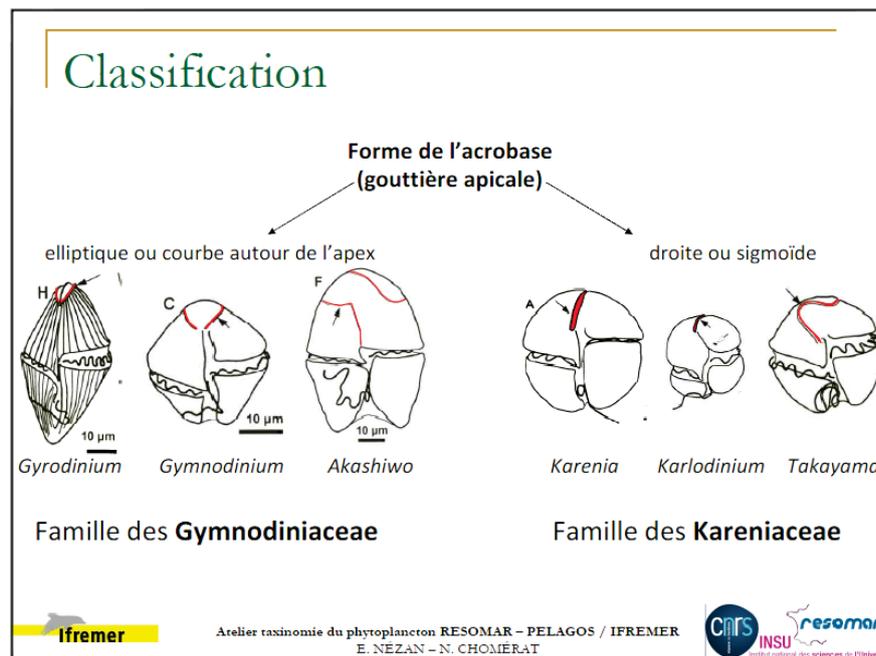
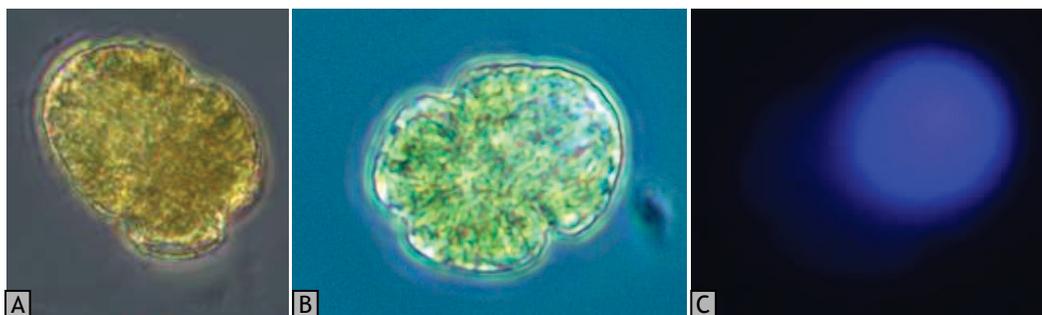


Figure 5 : Planche extraite de la présentation sur les dinoflagellés par E. Nézan et N. Chomérat à l'atelier taxinomie du phytoplancton à Roscoff le 9 décembre 2015.

Gyrodinium instriatum Freudenthal & J.J.Lee, 1963 syn. De *Levanderina fissa* (Levander) Ø.Moestrup, P.Hakanen, G.Hansen, N.Daugbjerg & M.Ellegaard, 2014)

Pour ce taxon, l'espèce correspondante proposée dans la liste est *Gyrodinium instriatum* qui est synonyme de *Levanderina fissa*.

20 analystes ont reconnu le genre dont huit l'espèce. L'analyste H-5 a identifié incorrectement l'espèce *Glenodinium foliaceum* (synonyme de *Kryptoperidinium foliaceum* (F. Stein) Lindemann, 1924).



Photos 11 : *Levanderina fissa* échantillon IPI 2018
 photo A : N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)
 photo B et C : Aude Piraud (C : épifluorescence)
 taille des cellules Longueur 45 µm largeur : 35 µm

Ce dinoflagellé nu de forme ovoïde en vue ventrale, est sphérique à légèrement comprimé dorso-ventralement. L'épicone est arrondi et quelque fois tronqué. L'hypocone est bilobé car séparé par le sulcus qui s'étend au delà de l'antapex. Le cingulum est équatorial. La photo C permet de visualiser le noyau de la cellule de la photo B, celui ci est sphérique et situé dans l'épicone de la cellule.

Glenodinium foliaceum (synonyme de *Kryptoperidinium foliaceum*) qui a été proposé par l'analyste H5, est un dinoflagellé cuirassé alors que *Levanderina fissa* n'a pas de thèque. Cela peut se vérifier grâce à l'épifluorescence mais le laboratoire de cet analyste n'était pas encore équipé lors de cet exercice. Les cellules de *Kryptoperidinium foliaceum* sont de forme plutôt arrondie et clairement aplati dorso-ventralement. Le sulcus est court et particulièrement fin. Son noyau est central alors que chez *Levanderina fissa* il se trouve dans l'épicone.

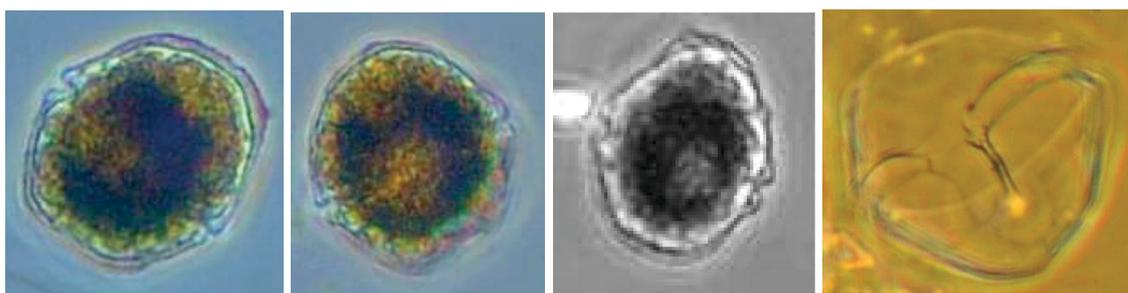


Photo 12 : *Kryptoperidinium foliaceum* Bassin d'Arcachon 2006 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

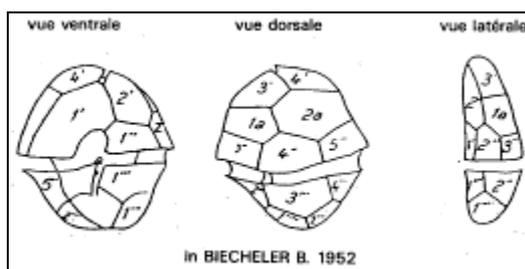
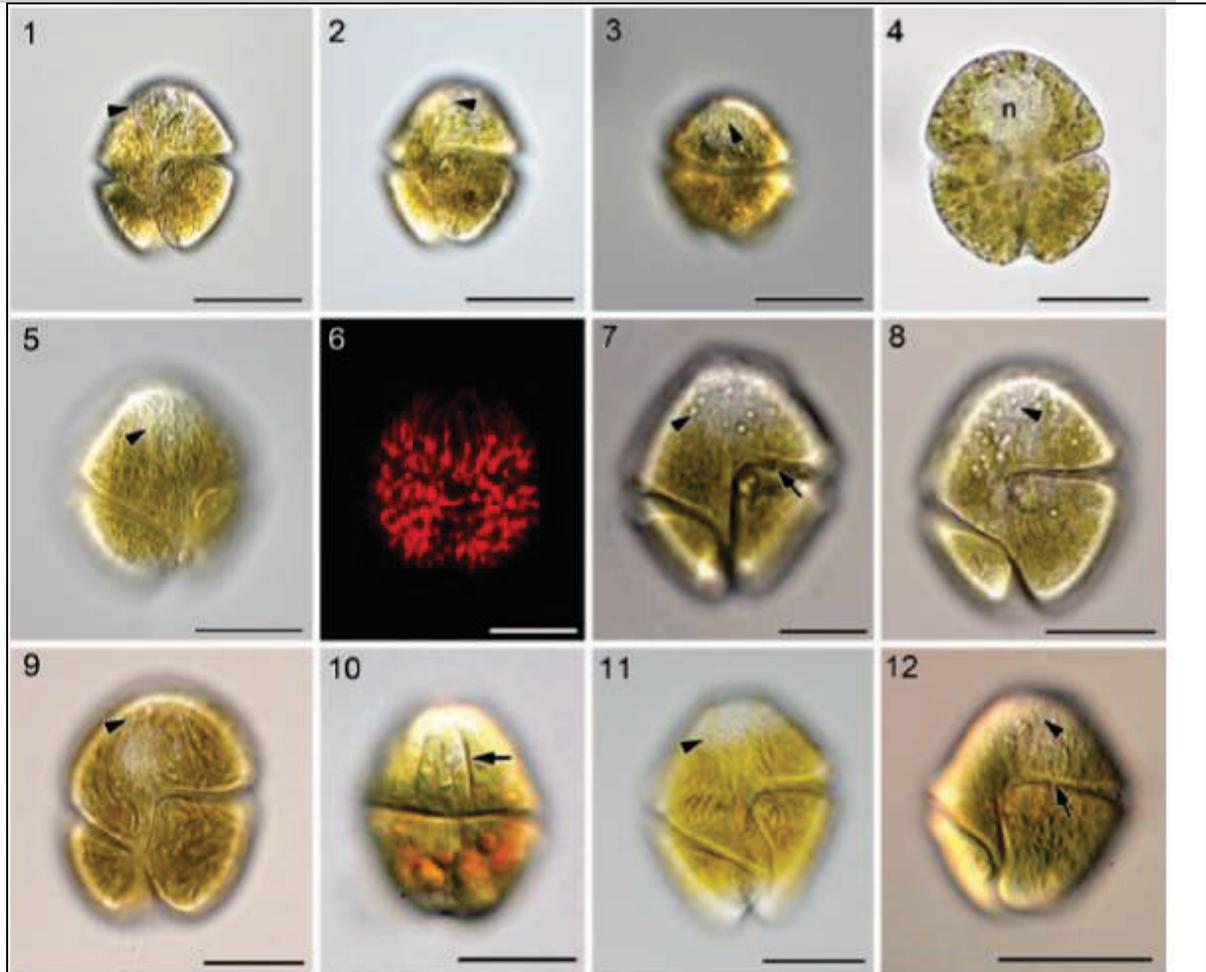


Figure 6 : *Kryptoperidinium foliaceum* in Biecheler B. 1925



Figs 1–12. Light microscopy of living cells of *Levanderina fissa* comb. nov. Scale bars = 20 μ m.

Figs 1–4. Strain K-1769 from the type locality of *Gymnodinium fissum* at Lövö, southern Finland.

Figs 1, 2. Ventral view of the same cell at different focal levels showing the ASC (arrowhead).

Fig. 3. ASC (arrowhead) from the dorsal side.

Fig. 4. Deeper focal level showing spherical nucleus (n) in the epicone.

Figs 5, 6. Strain K-1727 from the Åland Islands, Finland.

Fig. 5. Ventral view, ASC (arrowhead).

Fig. 6. Epifluorescence micrograph showing chloroplasts.

Fig. 7. Strain K-0641 from the Rhode River, USA. Ventral view, ASC (arrowhead), transverse flagellum (arrow).

Fig. 8. Strain K-0675 from the Santo Andre lagoon, Portugal. Ventral view, ASC (arrowhead).

Figs 9, 10. Strain K-1067 from Texas, Gulf of Mexico.

Fig. 9. Ventral view, ASC (arrowhead).

Fig. 10. Dorsal view, furrows (arrow) in the epicone.

Fig. 11. Strain K-1273 from Puerto Rico. Ventral view, ASC (arrowhead).

Fig. 12. Strain CCMP 1310 from Perch Pond, Falmouth, Massachusetts, USA. Ventral view, ASC (arrowhead), transverse flagellum (arrow).

Figure 7 : Planche extraite de Moestrup, O., Hakanen, P., Hansen, G., Daugbjerg, N. & Ellegaard, M. (2014).

On *Levanderina fissa* gen. & comb. nov. (Dinophyceae) (syn. *Gymnodinium fissum*, *Gyrodinium instriatum*, *Gyr. uncatenum*), a dinoflagellate with a very unusual sulcus. *Phycologia* 53(3): 265-292, 77 figs.

Prorocentrum micans Ehrenberg, 1834

Tous les analystes ont reconnu l'espèce *Prorocentrum micans*.

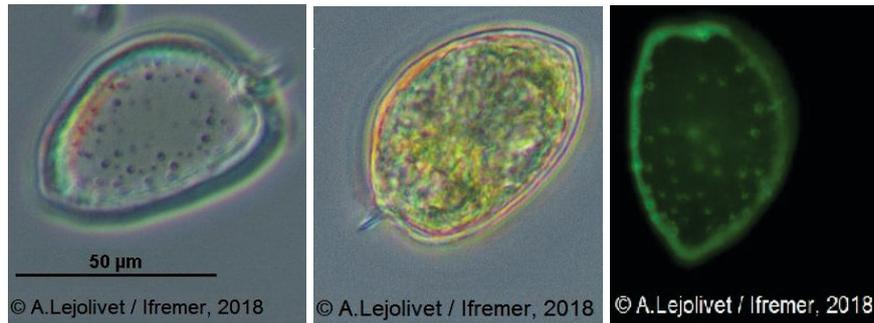


Photo 13 : *Prorocentrum micans* échantillon IPI 2018 - photos A. Lejolviet
(microscope optique à contraste de phase et épifluorescence)
taille des cellules Longueur 58 µm largeur : 37 µm

La disposition des pores visibles au contraste de phase sur la valve vide et à l'épifluorescence sur des cellules pleines permet l'identification de l'espèce *P. micans* telle que schématisé sur la Figure 8.

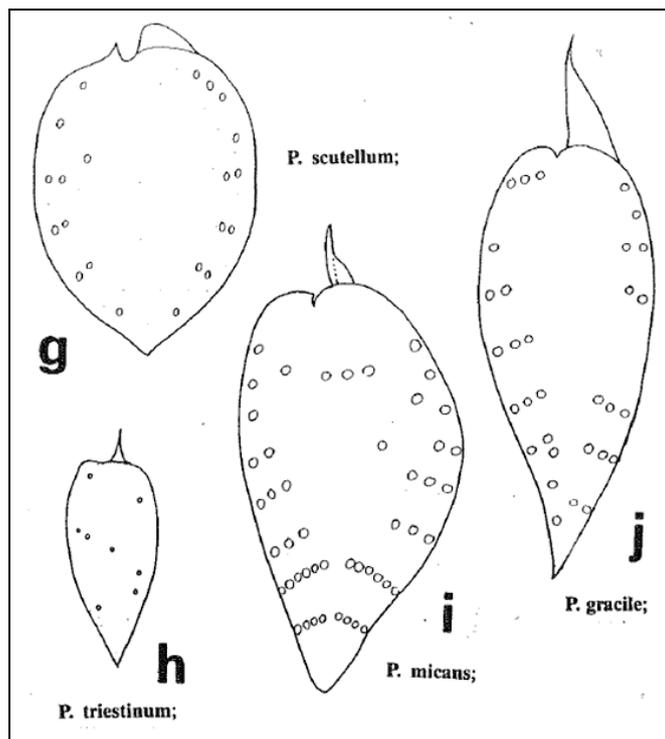


Figure 8 : Image extraite de l'ouvrage P. Lassus, fév. 1992 – Stage interne Ifremer phytoplankton

Melosira nummuloides C.Agardh 1824

16 analystes ont correctement identifié l'espèce *Melosira nummuloides* et cinq analystes se sont arrêtés au genre.

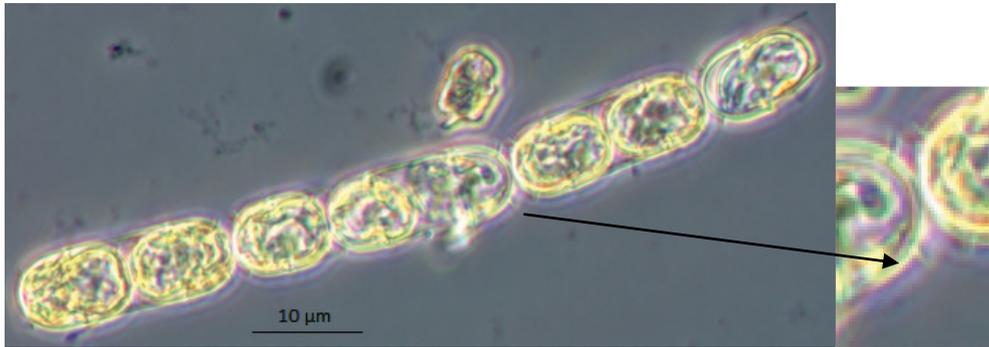


Photo 14 : *Melosira nummuloides* échantillon IPI 2018 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

Melosira nummuloides est caractérisé par une collerette membraneuse saillante au sommet de la valve autour de la jonction entre les cellules, visible sur le zoom de la Photo 14.

Ceratoneis closterium

Deux analystes du même laboratoire ont observés des *Ceratoneis closterium* dans chaque échantillon à des abondances allant de 80 à 1040 cel./L.

A noter que ces deux analystes ont réalisé leurs dénombrements sur les mêmes cuves.

Cette espèce étant absente des échantillons fournis pour l'exercice le laboratoire D doit envisager qu'il y ait eu une contamination locale au moment de la préparation des cuves (soit les cuves elles mêmes, soit le matériel de transfert des échantillons).

3.3 RÉSULTATS DES TESTS D'HOMOGENÉITÉ ET DE STABILITÉ

Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité sont résumés dans le Tableau 4. Leur implication sur les résultats de « l'essai Ifremer » est également exposée

Tableau 4 : résultats des tests d'homogénéité et de stabilité selon la norme ISO 13528:2015

Taxon	F-test	Critère d'homogénéité	Critère étendu d'homogénéité	Critère de stabilité	Critère étendu de stabilité
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	Ok	Not ok	Ok	Not ok	Ok
<i>Heterocapsa triquetra</i>	Not ok	Not ok	Not ok	Ok	Ok
<i>Amphidinium carterae</i>	Not ok	Not ok	Not ok	Ok	Ok
<i>Thalassiosira rotula/gravida</i>	Ok	Not ok	Not ok	Not ok	Ok
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima complex</i>	Ok	Not ok	Ok	Not ok	Ok
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	Ok	Not ok	Not ok	Not ok	Ok
<i>Karenia mikimotoi</i>	Not ok	Not ok	Not ok	Ok	Ok
<i>Gymnodinium/Gyrodinium sp.</i>	Not ok	Not ok	Not ok	Not ok	Ok
<i>Prorocentrum micans</i>	Not ok	Not ok	Not ok	Ok	Ok
<i>Melosira nummuloides</i>	Ok	Not ok	Ok	Not ok	Ok

HOMOGENEITE DES ÉCHANTILLONS

Pour l'ensemble des taxons, la variance inter-échantillons contribue à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances (critère d'homogénéité non rempli).

L'analyse de variance (F-test) ne met en évidence aucune différence significative entre les échantillons pour les taxons *Dactyliosolen fragilissimus*, *Melosira nummuloides* et *Pseudo-nitzschia delicatissima complex*. De plus, le critère étendu est rempli pour ces trois taxons. D'après la norme NF EN ISO/CEI 17043 citée par Salas et Larsen (2017), il faut s'assurer que l'incertitude des valeurs assignées ou que l'évaluation des résultats prend en compte le fait que les critères d'homogénéité ne sont pas entièrement remplis. Dans le présent exercice, l'incertitude de la valeur assignée est négligeable pour l'ensemble des taxons (Tableau 5).

Pour les taxons *Dactyliosolen fragilissimus*, *Melosira nummuloides* et *Pseudo-nitzschia delicatissima complex*, compte tenu du fait que deux critères au moins sont remplis, et que l'incertitude de la valeur assignée est négligeable, il est considéré que la valeur assignée est suffisamment bien estimée à partir des résultats des participants.

Tableau 5 : Valeurs pour chaque taxon de la valeur assignée X_s , de l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude $\hat{\sigma}_s$, du nombre de participants (p) pris en compte pour le calcul des valeurs X_s et $\hat{\sigma}_s$, ainsi que de l'incertitude de la valeur assignée $u(X_s)$.

	A. <i>carterae</i>	C. <i>lorenzianus</i>	D. <i>fragilissimus</i>	Gymno./ Gyro. sp.	H. <i>triquetra</i>	K. mikimotoi	M. <i>nummuloides</i>	P. <i>micans</i>	P.-n. <i>delicatissima</i> complex	T. <i>rotula/</i> <i>gravida</i>
X_s (log ₁₀)	4.004	3.510	4.357	3.065	4.249	3.470	3.277	3.392	3.407	3.710
$\hat{\sigma}_s$ (log ₁₀)	0.179	0.104	0.104	0.133	0.146	0.269	0.166	0.157	0.156	0.038
p	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
$u(X_s)$	0.050	0.029	0.029	0.037	0.041	0.075	0.046	0.044	0.044	0.010
Impact de l'incertitude de la valeur assignée	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.

Le critère étendu n'est en revanche pas rempli pour les taxons *Amphidinium carterae*, *Chaetoceros lorenzianus*, *Gymnodinium/Gyrodinium sp.*, *Heterocapsa triquetra*, *Karenia mikimotoi*, *Prorocentrum micans* et *Thalassiosira rotula/gravida*. Bien que pour *Chaetoceros lorenzianus* et *Thalassiosira rotula/gravida*, l'analyse de variance (F-test) ne mette en évidence aucune différence significative entre les échantillons, les échantillons ne sont tout de même pas considérés comme homogènes pour ces sept taxons. Il a donc été décidé de remplacer $\hat{\sigma}_s$ par $\hat{\sigma}'_s$ (cf. section 2.3) dans le calcul des scores z pour ces sept taxons (cf. équation de la section 2.2).

STABILITE DANS LE TEMPS

Les deux critères des tests de stabilité sont remplis pour les taxons *A. carterae*, *H. triquetra*, *K. mikimotoi* et *P. micans*. Les échantillons sont donc considérés comme stables pour ces quatre taxons.

Pour *C. lorenzianus*, *D. fragilissimus*, *Gymno./Gyro. sp.*, *Melosira nummuloides*, *P.-n. delicatissima complex* et *T. rotula/gravida*, seul le critère étendu est rempli. Cependant, pour *C. lorenzianus*, *Gymno./Gyro. sp.* et *T. rotula/gravida*, les échantillons ne sont pas considérés comme homogènes, ce qui pourrait avoir une influence sur le résultat du test de stabilité.

Globalement les échantillons sont considérés comme stables pour tous les taxons, ceci uniquement jusqu'à ouverture des ampoules avant préparation des cuves à décanter.

Pour envisager un problème dû à une dégradation des cellules, il faut tenir compte des délais entre la préparation des cuves à décanter et l'analyse (délai décant/anal du Tableau 1).

BIAIS

Il existe un possible biais pour les taxons *A. carterae*, *D. fragilissimus*, *Gymno./Gyro. sp.*, *H. triquetra*, *K. mikimotoi* et *P.-n. delicatissima complex* car l'écart entre la moyenne obtenue lors des tests d'homogénéité et la valeur assignée obtenue à partir des résultats des participants est supérieur à deux fois l'incertitude type de cet écart (Tableau 6). Cependant, aucun élément connu ne permet de trancher entre un biais de la méthode de mesure de X_{ref} et un biais commun dans les résultats des participants.

Tableau 6 : Pour chaque espèce, valeurs de la différence entre la moyenne obtenue lors des tests d'homogénéité et la valeur assignée $|X_{ref} - X_s|$, l'incertitude type de la différence $u(X_{ref} - X_s)$ et résultat de la comparaison entre la différence et deux fois son incertitude type.

	<i>A. carterae</i>	<i>C. lorenzianus</i>	<i>D. fragilissimus</i>	<i>Gymno. / Gyro. sp.</i>	<i>H. triquetra</i>	<i>K. mikimotoi</i>	<i>M. nummuloides</i>	<i>P. micans</i>	<i>P.-n. delicatissima complex</i>	<i>T. rotula/ grvida</i>
$ X_{ref} - X_s $	0.416	0.041	0.075	0.165	0.106	0.580	0.133	0.080	0.172	0.037
$u(X_{ref} - X_s)$	0.060	0.043	0.036	0.064	0.046	0.085	0.076	0.053	0.052	0.027
$\frac{ X_{ref} - X_s }{2 \times u(X_{ref} - X_s)} >$	OUI	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	NON

3.4 RÉSULTATS QUANTITATIFS DES PARTICIPANTS ET DISCUSSION

Tous les scores z, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats obtenus par analyste et par taxon dénombré, sont consultables dans un tableau en ANNEXE III et représentés sur une figure globale en ANNEXE IV.

Sur les pages suivantes, pour chaque taxon, sont représentés dans la première figure, le score z de chaque analyste et, dans la seconde figure, les abondances dénombrées dans chaque réplica avec la moyenne de référence matérialisée par une ligne bleue pointillée. Cette deuxième représentation permet d'explorer plus en détail les résultats et de décrire la répétabilité ou la fidélité des résultats par analyste et sur l'ensemble des résultats. Sur l'ensemble des figures, les codes des analystes ont été regroupés par laboratoire.

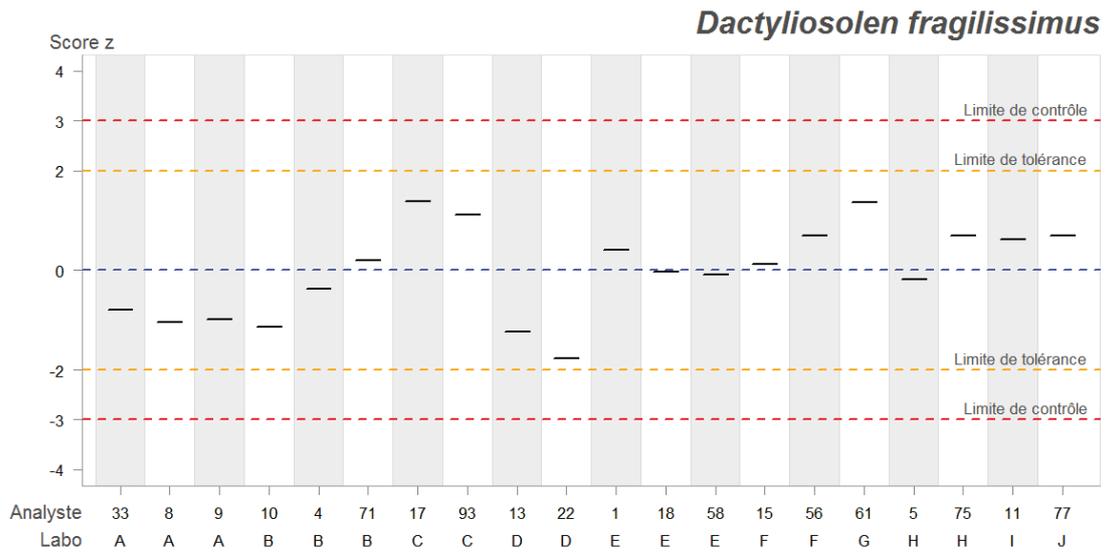


Figure 9 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log₁₀ des résultats pour *Dactyliosolen fragilissimus*.

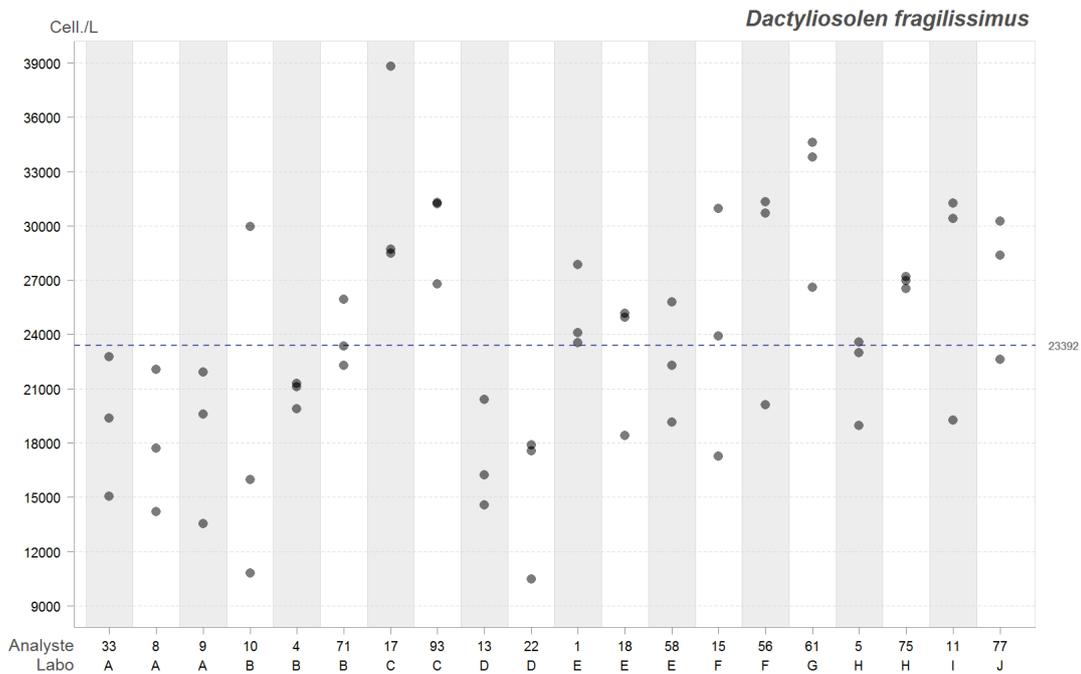


Figure 10 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Dactyliosolen fragilissimus*.

Les tests réalisés ont permis de conclure à une homogénéité suffisante des échantillons pour ce taxon. Concernant la stabilité, seul le critère étendu est rempli.

Pour tous les analystes, les scores z sont compris entre les limites de tolérance n'impliquant aucun signal d'avertissement.

On remarque que pour les laboratoires A et D, les résultats de chaque réplique sont inférieurs à la moyenne de référence. Contrairement aux résultats des laboratoires C et G qui sont tous supérieurs à la moyenne de référence.

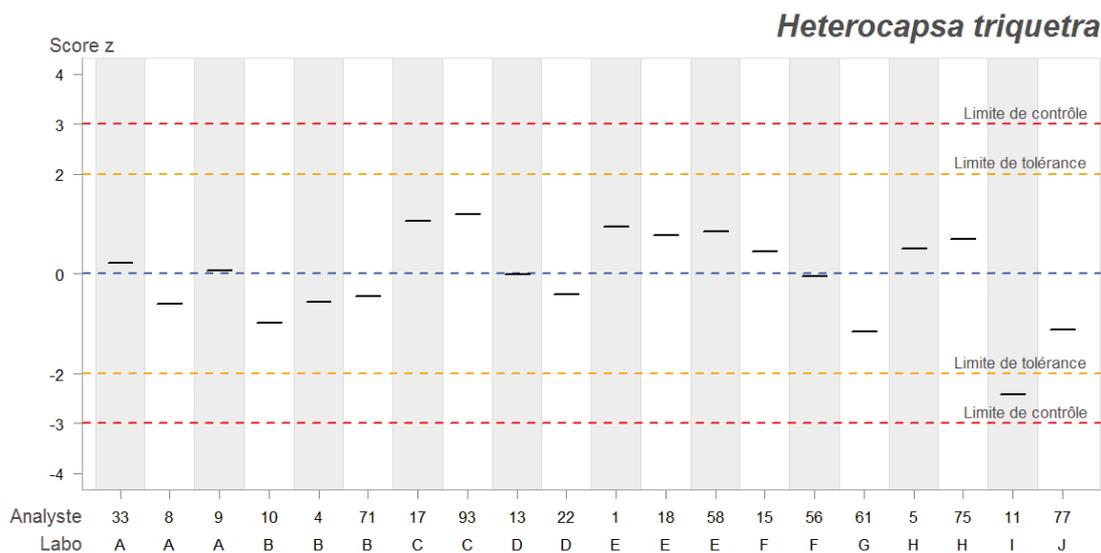


Figure 11 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Heterocapsa triquetra*.

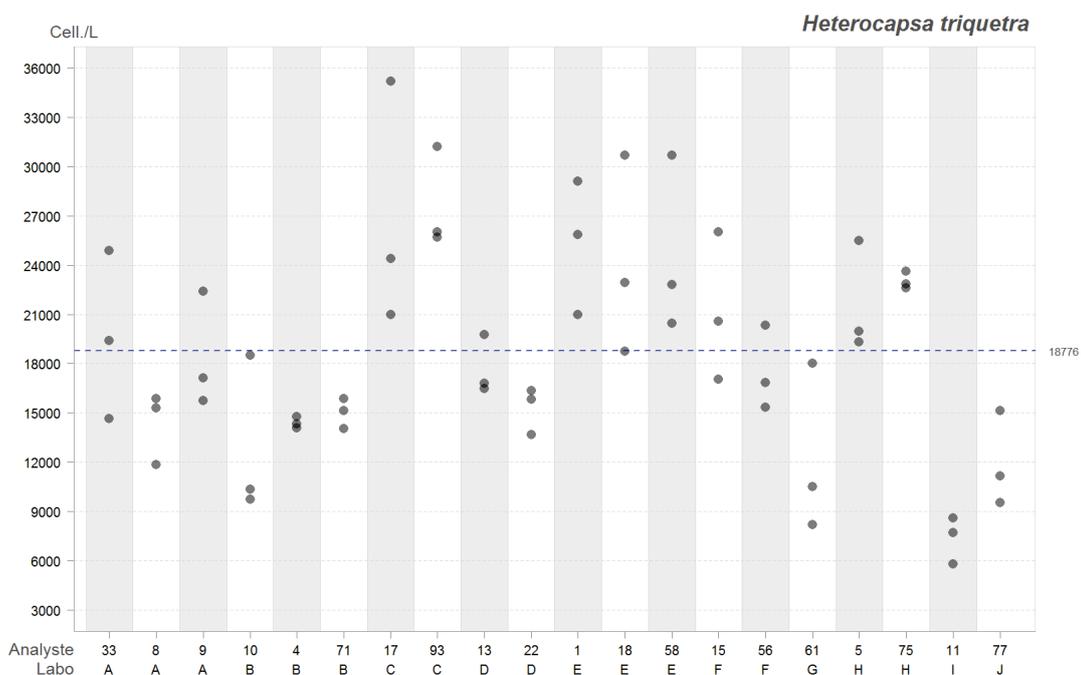


Figure 12 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Heterocapsa triquetra*.

Pour ce taxon, les résultats des tests d'homogénéité montrent une différence significative et non négligeable entre les échantillons. En conséquence, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude lors du calcul des scores-z.

Pour la majorité des analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement sauf pour l'analyste I-11 dont le score z est inférieur à la limite de contrôle avec une valeur de -2,41, ce qui implique un signal d'action pour cet analyste.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 5 800 et un maximum de 35 200 cell./L. avec une moyenne de référence de 18 776 cell./L.

Pour l'analyste I-11, les abondances des trois répliques sont les plus faibles et trois fois inférieures à la moyenne de référence. Malgré les résultats des tests d'homogénéité, il est conseillé à l'analyste de rechercher les causes possibles.

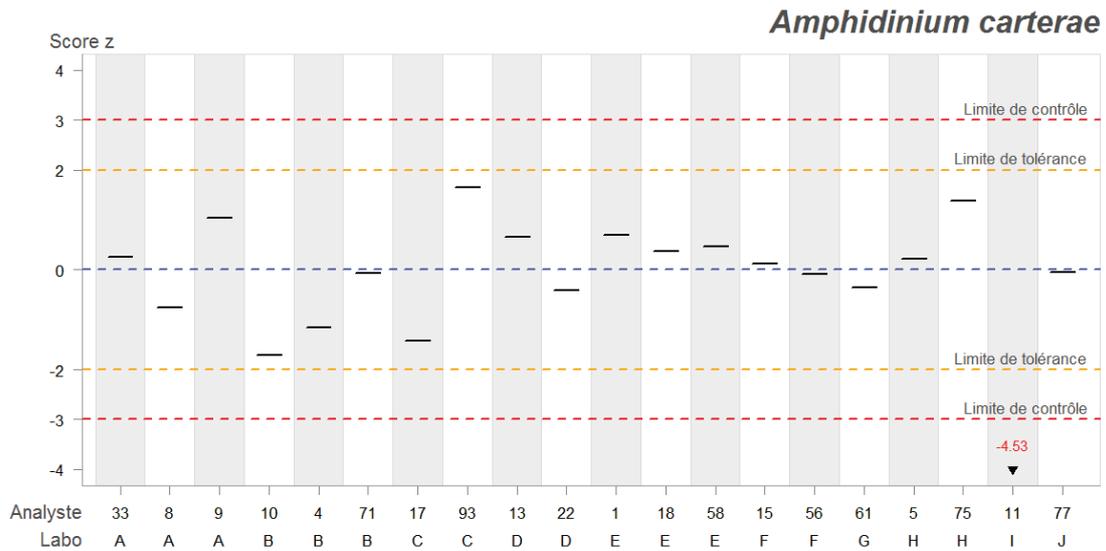


Figure 13 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Amphidinium carterae*.

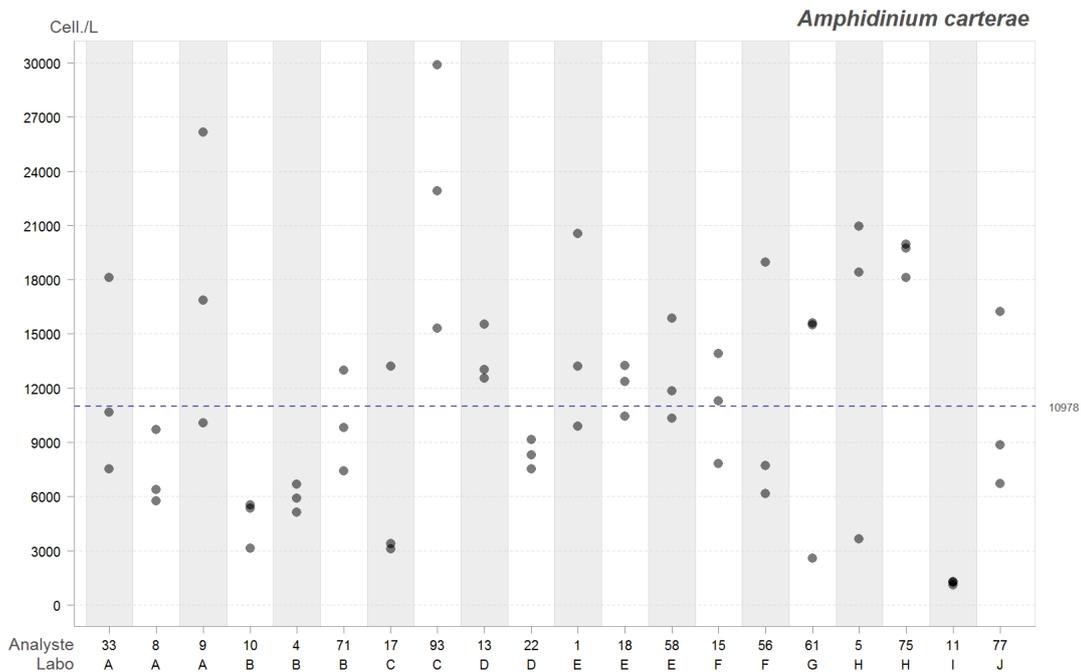


Figure 14 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Amphidinium carterae*.

Bien que les tests permettent de conclure sur une stabilité des échantillons pour ce taxon, les résultats des tests d'homogénéité montrent une différence significative et non négligeable entre les échantillons. En conséquence, pour l'évaluation de l'aptitude, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans le calcul des scores-z.

Pour l'analyste I-11, le score z est situé en dessous de la limite basse de contrôle, impliquant un signal d'action. Pour tous les autres analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant aucun signal.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 1 100 et un maximum de 29 900 cell./L., avec une moyenne de référence de 10 978 cell./L.

Pour l'analyste I-11, les abondances des trois répliques sont les plus faibles et 10 fois inférieures à la moyenne de référence.

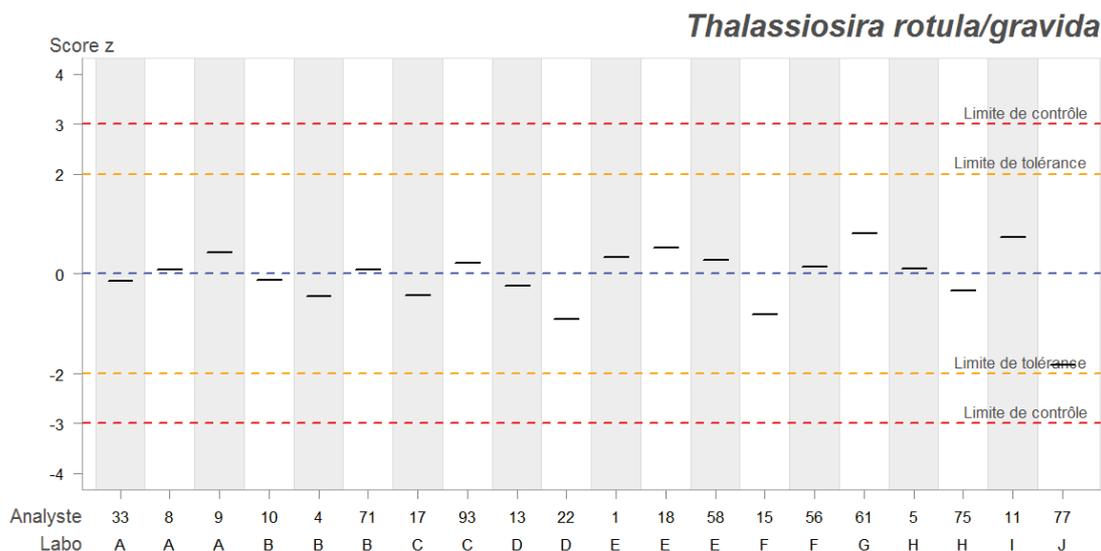


Figure 15 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Thalassiosira gravida*.

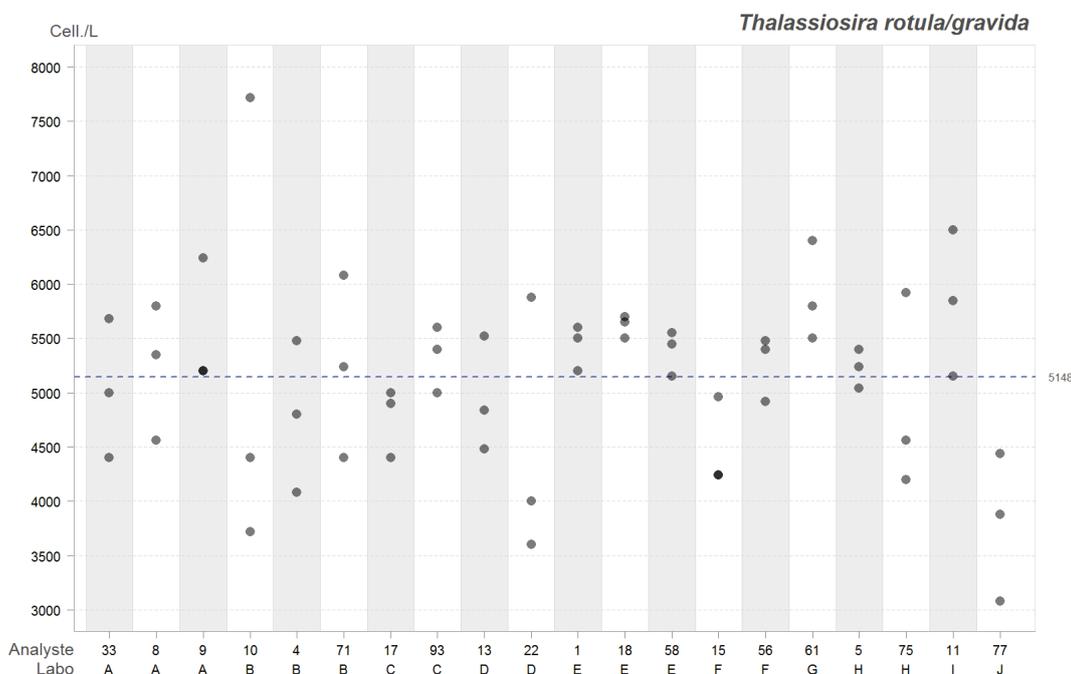


Figure 16 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Thalassiosira gravida*.

Pour ce taxon, les échantillons ne sont pas considérés comme homogènes, ce qui pourrait avoir une influence sur le résultat du test de stabilité. Toutefois, le critère étendu de stabilité étant rempli, les échantillons sont considérés comme stables. En conséquence, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude lors du calcul des scores-z.

Tous les scores z sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement pour les analystes.

La répartition des résultats d'abondances s'étend de 3 080 à 7 720 cell./L. avec une moyenne de 5 148 cell./L.

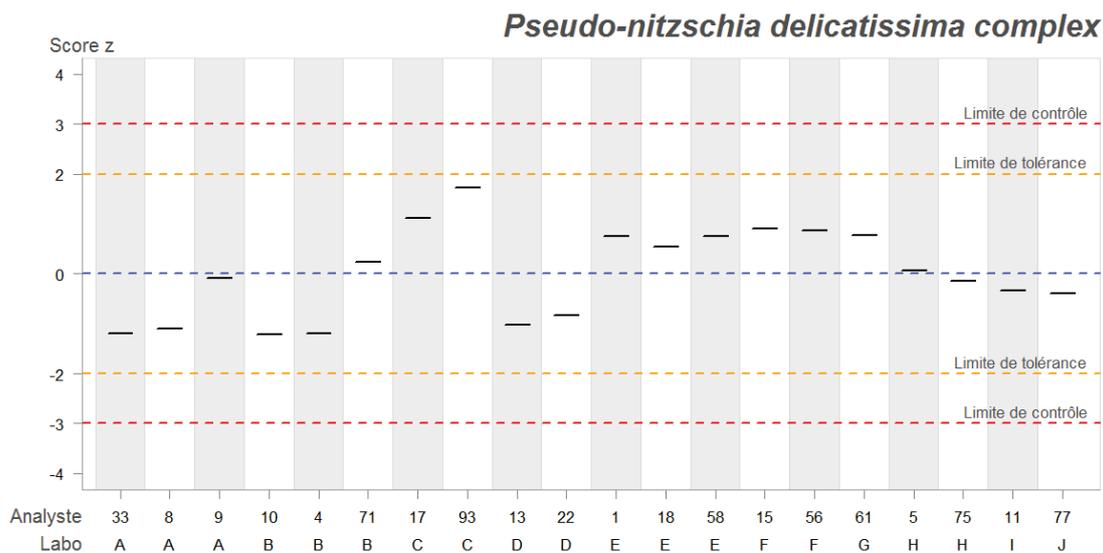


Figure 17 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex.

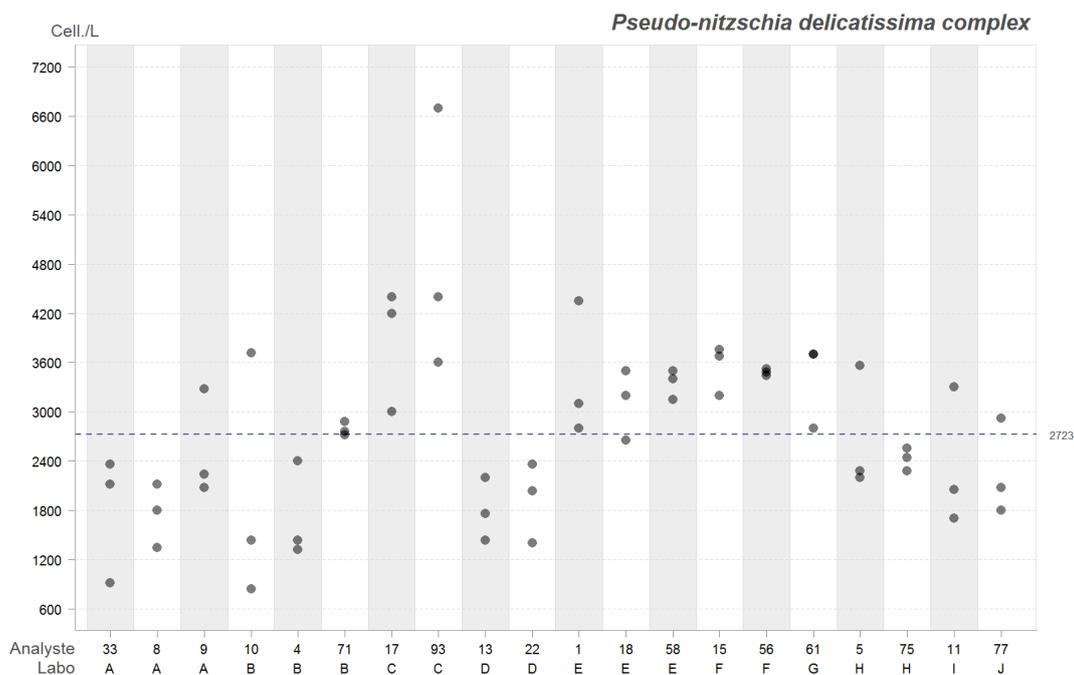


Figure 18 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex.

Les tests réalisés ont permis de conclure à une homogénéité et une stabilité suffisante des échantillons pour ce taxon.

Tous les scores z sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement pour les analystes.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 840 et un maximum de 6 700 cell./L. avec une moyenne de 2 723 cell./L.

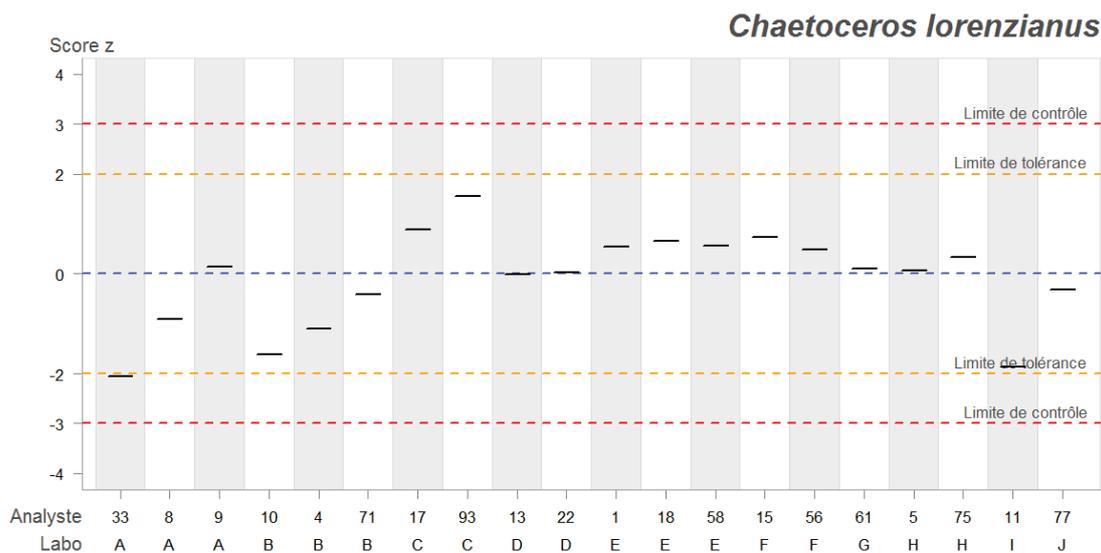


Figure 19 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Chaetoceros lorenzianus*.

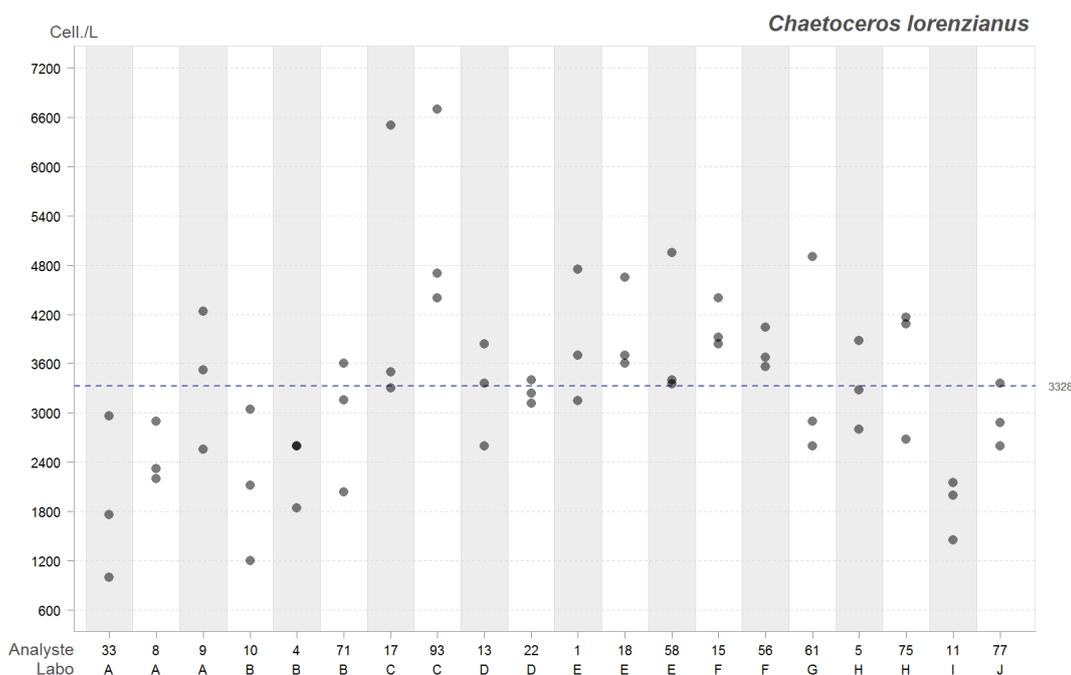


Figure 20 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Chaetoceros lorenzianus*.

Pour ce taxon, les échantillons ne sont pas considérés comme homogènes, ce qui pourrait avoir une influence sur le résultat du test de stabilité. Toutefois, le critère étendu de stabilité étant rempli, les échantillons sont considérés comme stables. En conséquence, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude lors du calcul des scores-z.

Pour tous les analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, sauf pour l'analyste A-33, dont le score z est légèrement inférieur à la limite basse de tolérance avec une valeur de -2.06. Ceci implique un signal d'avertissement pour cet analyste.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 1 000 et un maximum de 7 600 cell./L. avec une moyenne de 3 328 cell./L.

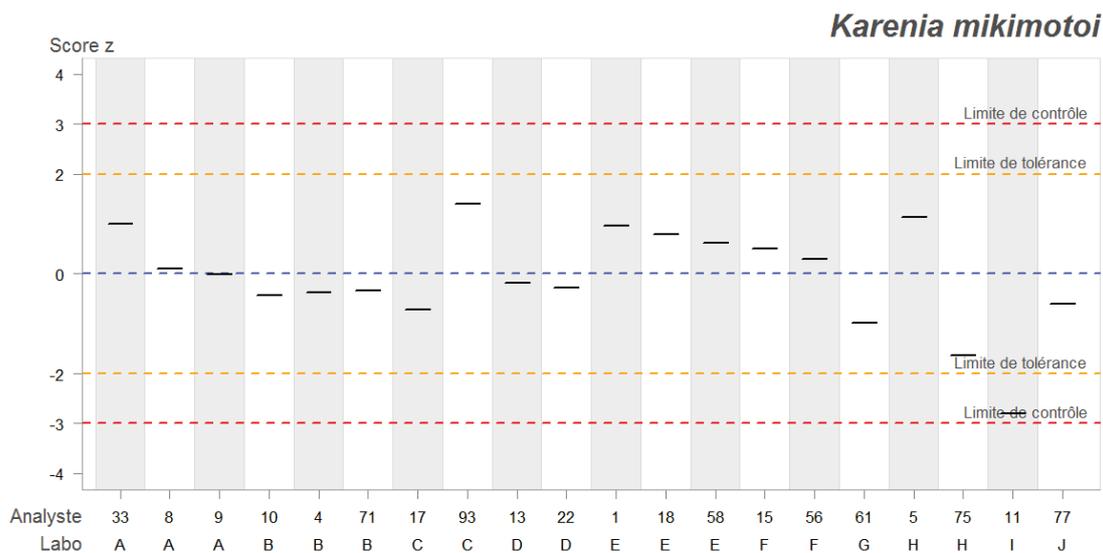


Figure 21 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Karenia mikimotoi*.

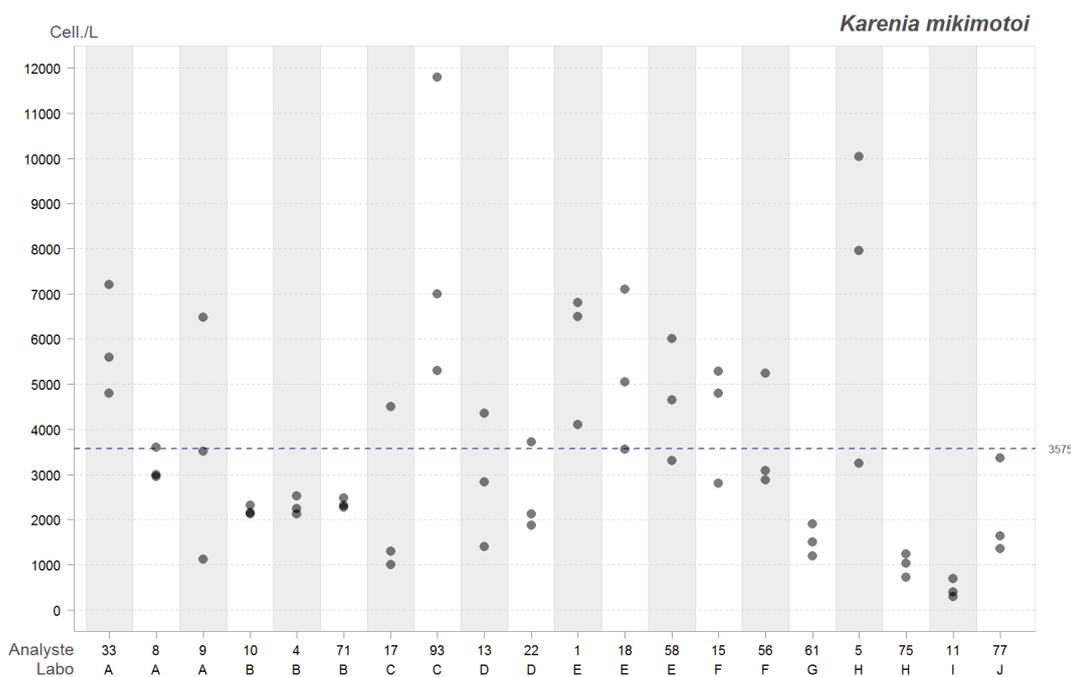


Figure 22 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Karenia mikimotoi*.

Pour ce taxon, bien que les tests concluent à une bonne stabilité, les résultats des tests d'homogénéité montrent une différence significative entre les échantillons. En conséquence, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude lors du calcul des scores-z.

Pour tous les analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, sauf pour l'analyste I-11 (score z : -2,81) impliquant un signal d'avertissement pour cet analyste.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 300 et un maximum de 11800 cell./L. avec une moyenne de référence de 3 575 cell./L. Les résultats de l'analyste I-11 sont les plus faibles pour les trois répliques et sont 12 fois inférieurs à la moyenne de référence.

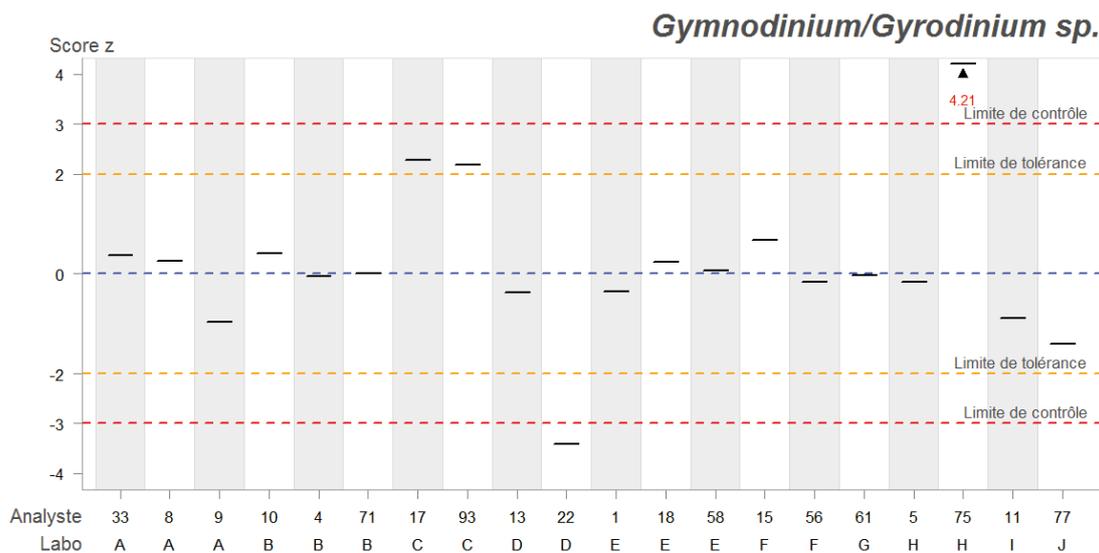


Figure 23 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Gymnodinium/Gyrodinium sp.* (*Gyrodinium instriatum*).

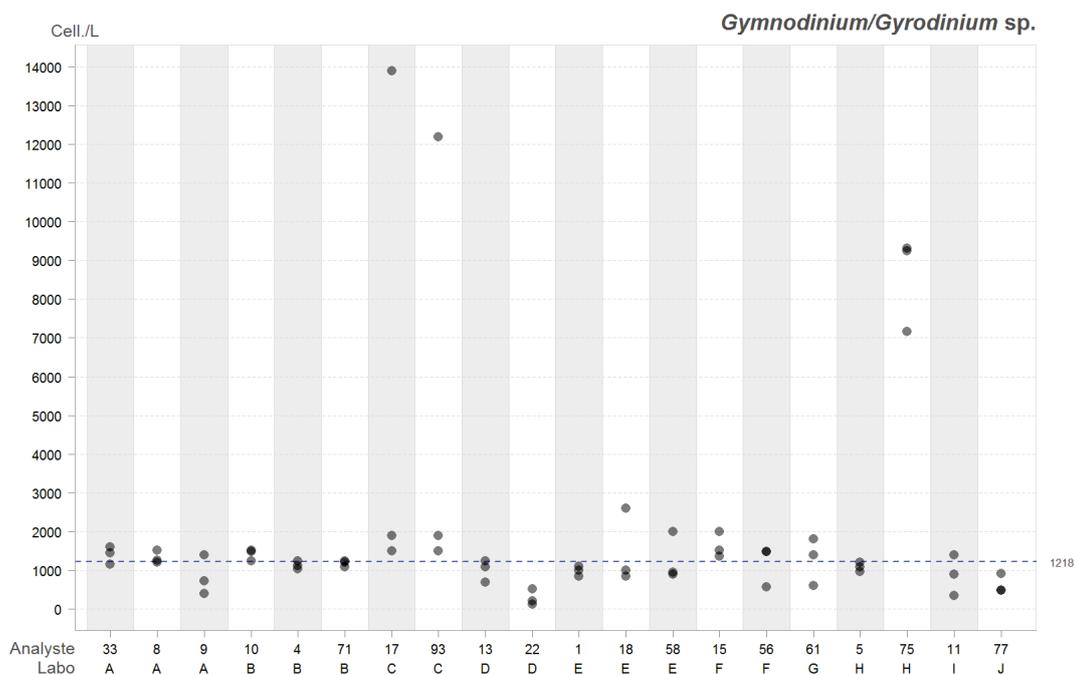


Figure 24 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Gymnodinium/Gyrodinium sp.* (*Gyrodinium instriatum*).

Pour ce taxon, les échantillons ne sont pas considérés comme homogènes, ce qui pourrait avoir une influence sur le résultat du test de stabilité. Toutefois, le critère étendu de stabilité étant rempli, les échantillons sont considérés comme stables. En conséquence, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude lors du calcul des scores-z.

Pour 16 analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance. Pour les analystes **C-17** et **C-93**, les scores z sont supérieurs à la limite haute de tolérance impliquant un signal d'avertissement pour ces deux analystes du même laboratoire. Pour l'analyste **D-22** le score z est inférieur à la limite basse de contrôle, et pour l'analyste **H-75** il est supérieur à la limite haute de contrôle ce qui implique un signal d'action pour ce deux analystes.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 120 et un maximum de 13 900 cell./L. avec une moyenne de 1 218 cell./L.

On observe que la majorité des résultats est resserrée autour de la moyenne, seuls cinq résultats sont très supérieurs, avec des valeurs supérieures à 7 000 cell./L, ce qui est similaire aux résultats présentés dans le rapport de l'IPI pour ce taxon. Pour les 99 participants à l'IPI, on retrouve quelques résultats également aberrants (8 sur 297 comptages).

Pour les analystes du labo C, un seul des trois réplicas montre une abondance dix fois supérieure à la moyenne. Ces deux résultats correspondent aux comptages du même réplica mis à décanter séparément par chaque analyste du labo C. Pour l'analyste H-75 les résultats des trois réplicas sont aberrants.

Compte tenu de ces éléments, pour ces analystes on ne peut pas conclure avec certitude à un défaut dans leurs pratiques. Ces résultats aberrants pouvant être dus à un problème d'homogénéité ayant affecté quelques rares réplicas sur l'ensemble des échantillons.

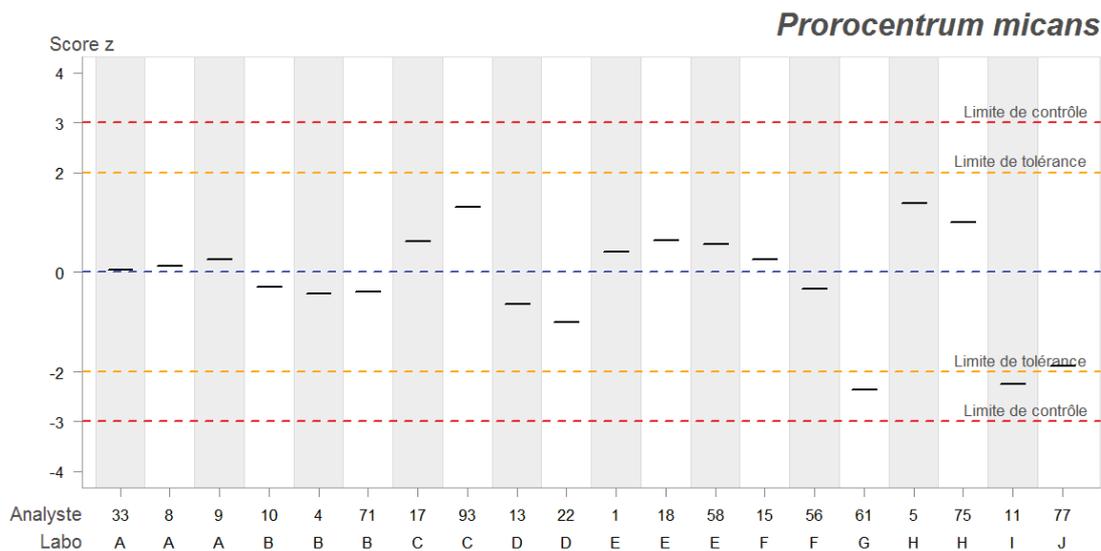


Figure 25 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Prorocentrum micans*.

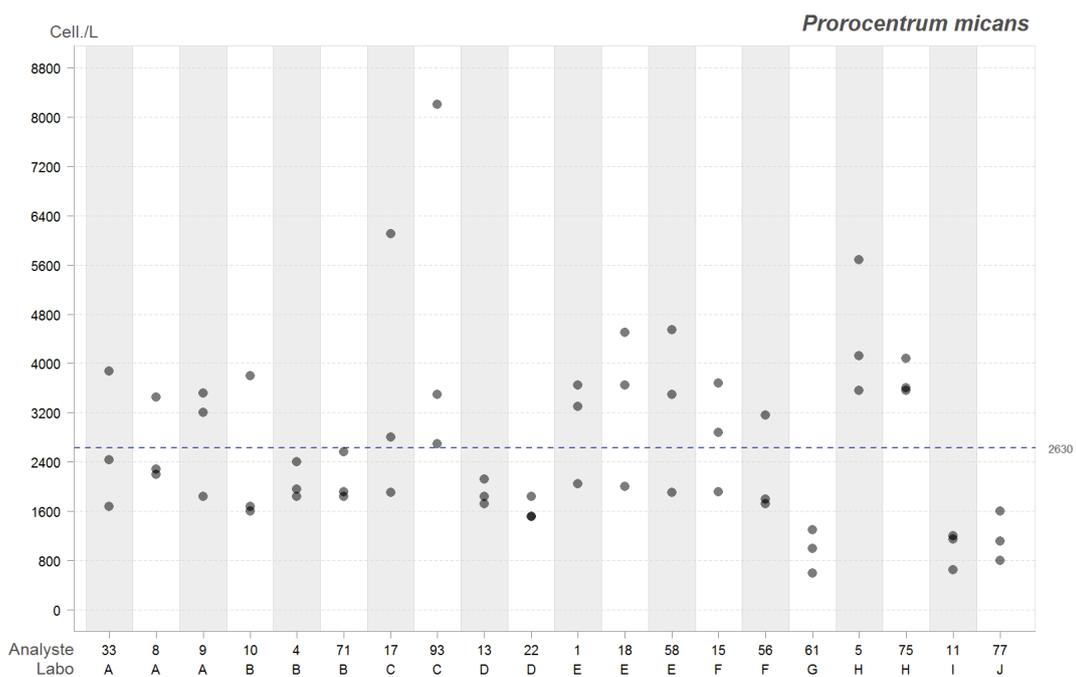


Figure 26 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Prorocentrum micans*.

Bien que les tests permettent de conclure à une stabilité des échantillons pour ce taxon, les résultats des tests d'homogénéité montrent une différence significative entre les échantillons. En conséquence, pour l'évaluation de l'aptitude, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans le calcul des scores-z.

Pour 18 analystes les scores z sont compris entre les limites de tolérance. Pour les analystes **G-61** et **I-11**, les scores z sont inférieurs à la limite basse de tolérance, impliquant un signal d'avertissement pour ces deux analystes.

La répartition des résultats d'abondances s'étend de 600 à 8 200 cell./L. avec une moyenne de référence de 2 630 cell./L.

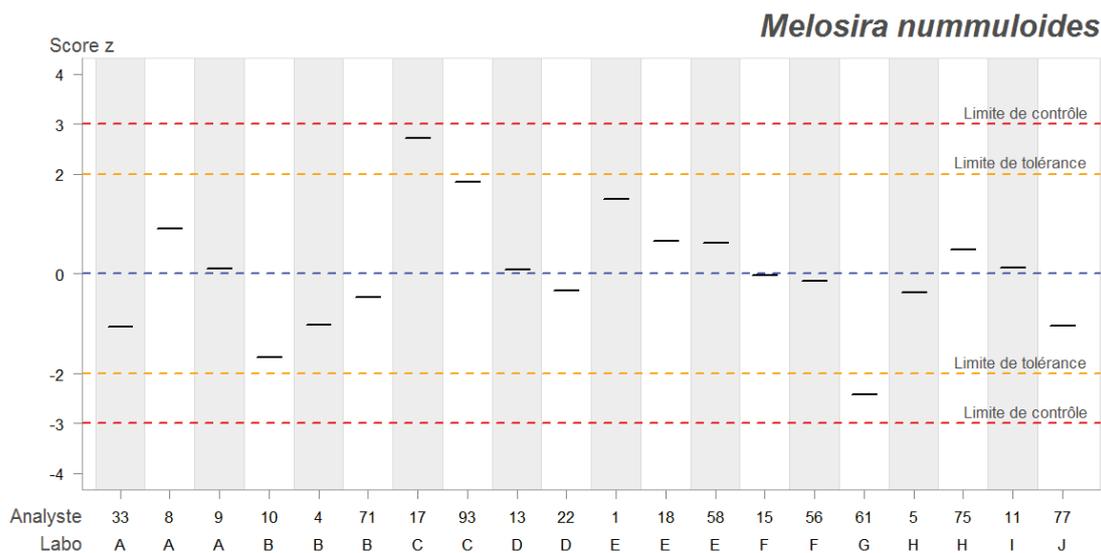


Figure 27 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Melosira nummuloides*.

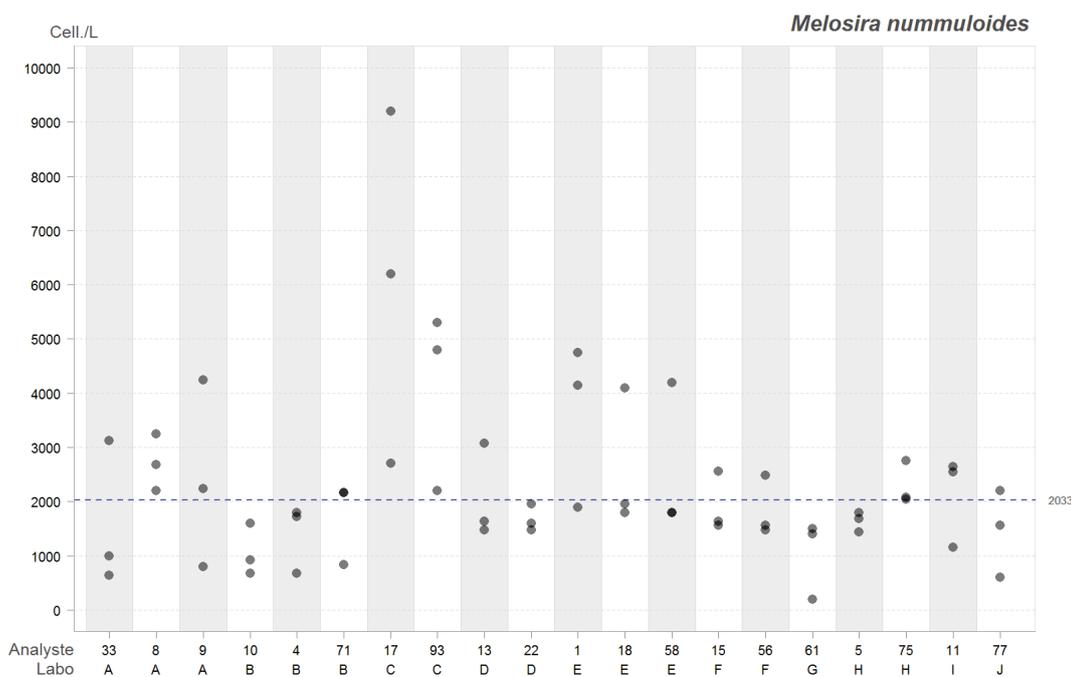


Figure 28 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Melosira nummuloides*.

Les tests réalisés ont permis de conclure à une homogénéité et une stabilité suffisante des échantillons pour ce taxon.

Pour 18 analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance. Pour l'analyste G-61 il est inférieur à la limite basse de tolérance (-2,42), et pour l'analyste C-17 il est supérieur à la limite haute de tolérance (2,73), impliquant pour ces deux analystes un signal d'avertissement.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 200 et un maximum de 9 200 cell./L. avec une moyenne de 2 033 cell./L.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE SUR LES RÉSULTATS

La proposition d'une liste fermée d'espèces pour le rendu des résultats n'est pas sans incidence sur la façon d'analyser les réponses et sa pertinence est discutable. Pour l'organisateur, l'utilisation de ce format de rendu permet une meilleure lisibilité des résultats des participants. Elle évite les erreurs de transcription et s'affranchit d'interprétation puisqu'elle interdit des identifications à des rangs taxinomiques non prévus, comme « dinoflagellé non identifié », « diatomée centrique », « dinoflagellé nu », etc. Néanmoins, ce type d'approche n'est pas réaliste et s'éloigne des conditions habituelles d'identification par les participants, car cette liste peut être interprétée comme une aide à l'identification des espèces et constituer un biais par rapport à la méthode. Cette liste peut également présenter des « pièges » avec plusieurs réponses correctes pour le même taxon (synonymes, groupement de taxons...).

Concernant les résultats qualitatifs, les identifications correctes au niveau des genres ou espèces cumulées représentent 98% des résultats avec 71% d'identifications correctes au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces. Ces scores sont très satisfaisants.

Seules les espèces *Karenia mikimotoi* et *Levanderina fissa* (Gymnodinium/Gyrodinium sp.) ont posé problème. Le genre *Karenia* n'a pas été identifié par les analystes C-17 et H-5, et l'analyste H-5 a confondu *Levanderina fissa* avec *Kryptoperidinium foliaceum*. Pour tous les autres taxons, l'espèce ou le genre ont correctement été identifiés par tous les analystes.

Concernant la confusion de l'analyste H-5 entre *Levanderina* qui est un dinoflagellé nu et *Kryptoperidinium* qui est un dinoflagellé cuirassé, si cet analyste avait été équipé d'un microscope à épifluorescence, cette erreur aurait pu être évitée grâce à la coloration spécifique de la cellulose qui constitue les thèques des dinoflagellés cuirassés.

Pour les *Chaetoceros*, cinq analystes ont pensé être en présence de deux ou trois espèces, et sept analystes n'ont pas été en mesure d'identifier certaines cellules au niveau de l'espèce. Alors que selon l'organisateur de l'IPI, il n'y avait qu'une seule espèce qui était *Chaetoceros lorenzianus*. Néanmoins, la diversité des morphologies des cellules dans les échantillons a légitimement généré le doute.

Enfin, pour deux analystes du même laboratoire (D-13 et D-22), quelques cellules de *Ceratoneis closterium* se sont retrouvées au fond de leurs cuves à décanter. Cette espèce était absente des échantillons et aucun autre analyste, ceux de l'exercice international compris, n'a observé cette espèce. Les analystes du laboratoire D devront s'interroger sur les sources probables de contamination et sur leur procédure de nettoyage de leur matériel.

Concernant les résultats quantitatifs, bien que les organisateurs de l'essai international aient investi dans un nouvel appareil pour améliorer l'homogénéisation de la solution mère, les résultats des tests d'homogénéité des échantillons sont décevants.

Pour les trois taxons *Dactyliosolen fragilissimus*, *Pseudo-nitzschia delicatissima complex* et *Melosira nummuloides*, les critères des tests d'homogénéité et de stabilité sont remplis. Pour ces trois taxons, si les scores z dépassent les limites de tolérance, les participants doivent chercher une ou des raisons dans leurs pratiques.

Pour les sept autres taxons soient : *Heterocapsa triquetra*, *Amphidinium carterae*, *Thalassiosira rotula*, *Chaetoceros lorenzianus*, *Karenia mikimotoi*, *Levanderina fissa* et *Prorocentrum micans*, les critères ne sont pas remplis pour l'homogénéité mais sont considérés comme stables. Pour ces sept taxons, l'écart-type inter-échantillons est inclus dans l'écart-type pour les calculs des scores z , afin de prendre en compte le manque d'homogénéité des échantillons. Pour tous ces taxons, en cas de dépassement du score z , il n'est pas possible de conclure avec certitude à un défaut de pratique de l'analyste. Il est toutefois conseillé à l'analyste de rechercher les causes possibles

Les scores z de tous les analystes sont compris entre les limites de tolérance pour : *Dactyliosolen fragilissimus*, *Pseudo-nitzschia delicatissima complex* et *Thalassiosira rotula/gravida*. Le taxon

qui a généré le plus de signaux est *Gymnodinium/Gyrodinium* sp. (*Levanderina fissa*) avec deux dépassements des limites de tolérance et deux dépassements des limites de contrôle.

Pour treize des vingt participants évalués, tous les scores z sont compris entre les limites de tolérance.

Sur les 200 scores z évalués (10 taxons x 20 analystes), 188 sont compris entre les limites de tolérance, ce qui représente 94% de résultats satisfaisants.

En ce qui concerne l'analyste I-11, pour le quel trois scores z dépassent les limites de tolérance et un les limites de contrôle, il faut noter qu'il avait signalé avoir observé une dégradation des échantillons et donc émis a priori des doutes sur les résultats de ses comptages. Cet analyste devra tenter d'identifier les causes de cette dégradation et, le cas échéant, proposer des mesures correctives pour les prochains exercices.

Tableau 7 : bilan des scores z

Tous score z < 2	1 score z > 2	2 score z > 2	1 score z > 3	3 scores z > 2 et 1 scores z > 3
13 analystes	2 analystes A-33 et C-93	2 analystes C-17 et G-61	2 analystes D-22 et H-75	1 analyste I-11

5. BILAN

C'est la sixième année de participation du personnel du réseau d'analystes du REPHY à l'IPI organisé par le Marine Institute de Galway, et la quatrième année de l'extension de cet essai à une Comparaison Inter-Analystes interne à l'Ifremer, impliquant la plupart des analystes du REPHY.

Ces résultats font l'objet de rapports dont l'objectif est d'apporter des éléments à l'ensemble du personnel du REPHY en vue d'une amélioration continue et de déterminer des actions à mettre en œuvre pour corriger d'éventuelles dérives ou améliorer les techniques.

L'extension de l'exercice à l'ensemble des analystes du REPHY, utilisant le matériel reçu par les candidats à l'IPI, a l'avantage pour l'Ifremer de s'affranchir de la partie préparatoire des échantillons à analyser ainsi que de la réalisation des tests d'homogénéité et de stabilité. En effet, cette partie est coûteuse et nécessite des compétences reconnues. Les résultats des évaluations obtenus revêtent ainsi un caractère certifié car les essais menés par un laboratoire accrédité, le Marine Institute de Galway, apporte cette assurance.

21 analystes sur les 25 qui constituent le réseau ont participé à l'exercice en 2018. Ce taux de participation est supérieur à celui de 2017 et est plutôt satisfaisant. Sur les quatre qui n'ont pas participé, deux sont des analystes en cours de formation et d'habilitation, un arrive en fin de carrière et un n'était pas disponible durant l'exercice.

Cette année, avec 98 % d'identifications correctes des taxa, les résultats reçus confirment les compétences des analystes dans l'identification du phytoplancton marin. La plupart des taxons présents ont pu être reconnus et les difficultés d'identification rencontrées lors de cet essai 2018 concernent principalement les dinoflagellés nus *Karenia mikimotoi* et *Levanderina fissa*.

En 2018, sur les 10 laboratoires participants, huit sont équipés d'un microscope à épifluorescence. Cette technique les a aidés à déterminer si les cellules étaient des dinoflagellés nus ou cuirassés et à orienter leur identification. Il reste à équiper trois laboratoires du réseau, ce qui sera fait en 2019.

Concernant les résultats quantitatifs, 94% des scores z sont compris entre les limites de tolérance ce qui est globalement satisfaisant.

Après six années de participation, chaque analyste dispose d'un nombre de résultats de dénombrement évalués qu'il serait intéressant de compiler, afin de déterminer si une amélioration est observée ou pas, et le cas échéant en rechercher les causes.

Grossel Hubert (2007). **Essai interlaboratoires pour le dénombrement phytoplanctonique par la méthode d'Utermöhl.**

Grossel Hubert (2009). **Essai interlaboratoires pour le dénombrement et la taxinomie du phytoplancton marin - Convention 2009 - Action 1.** <http://archimer.ifremer.fr/doc/00019/12979/>

Neaud-Masson Nadine (2015). **Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique photonique - Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY.** Document de méthode. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00292/40293/>

Rafael Salas & Jacob Larsen (2015). PHY-ICN-15-MI1 VR 1.0. **BEQUALM Phytoplankton proficiency test in the abundance and composition of marine microalgae 2015 report.** <http://www.nmbaqcs.org/media/1613/phy-icn-15-mi1-final-report-vr1.pdf>

Nadine Neaud-Masson, Mélanie Brun – **Essai inter-analystes Ifremer pour l'évaluation de la qualité des connaissances en systématique du phytoplancton marin – Rapport d'évaluation des compétences en détermination et en dénombrement du phytoplancton marin dans le cadre du REPHY.** Rapport AQUAREF 2015 – 43 p.

Rafael Salas & Jacob Larsen (2016). PHY-ICN-16-MI1 VR 1.0. **International Phytoplankton Intercomparison proficiency test in the abundance and composition of marine microalgae 2016 report** <http://www.nmbaqcs.org/media/1676/phy-icn-16-mi1-final-report-vr1.pdf>

Neaud-Masson Nadine, Brun Melanie (2016). **Essai inter-analystes Ifremer pour l'évaluation de la qualité des connaissances en taxinomie et dénombrement du phytoplancton marin – Rapport d'évaluation des analystes du phytoplancton marin dans le cadre du REPHY . Aquaref B3–9 –Rapport sur l'essai inter-analystes « détermination et dénombrement du phytoplancton » .** <https://archimer.ifremer.fr/doc/00340/45158/>

Rafael Salas & Jacob Larsen (2017). PHY-ICN-17-MI1 VR 1.0. **International Phytoplankton Intercomparison proficiency test in the abundance and composition of marine microalgae 2017 report.**

Neaud-Masson Nadine, Brun Melanie, Chomérat Nicolas (2017). **Essai d'aptitude par comparaison Inter-Analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin dans le cadre du REPHY.** Résultats exercice 2016 . ODE/VIGIES/17-12 . <https://archimer.ifremer.fr/doc/00388/49923/>

Rafael Salas, Debbie Walsh & Jacob Larsen (2017). **International Phytoplankton Intercomparison (IPI) proficiency testing in the abundance and composition of marine microalgae 2018 report.**

Normes

NF ISO 13528 (octobre 2015). **Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires.**

NF EN 15204 (2006), **Qualité de l'eau – Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode d'Utermöhl).** Décembre 2006.

NF EN 15972 (2011), **Qualité de l'eau – Guide pour l'étude qualitative et quantitative du phytoplancton marin.** Décembre 2011.



IPI Phytoplankton Proficiency Test PHY-ICN-18-MI1 Vr1.0

Instructions

Please note that these instructions are designed strictly for use in this Intercomparison only.

- 1. Introduction**
- 2. Deadlines, checklists and forms**
- 3. Test method**
- 4. Equipment**
- 5. Sedimentation chambers and sample preparation**
- 6. Counting procedure and strategy**
- 7. Samples**
- 8. Counting guide IPI2018**
- 9. Online HABs taxonomic assessment in Oceanteacher**

1. Introduction

The Marine Institute, Galway, Ireland, conducts an annual International Phytoplankton Intercomparison (IPI) (formerly BEQUALM) on the abundance and composition of marine phytoplankton in water samples since 2005. First, under the auspices of the BEQUALM-NMBAQC umbrella and since 2011, in collaboration with the IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae of UNESCO, in Copenhagen, Denmark. The design and organization of this exercise continued under the Marine Institute- IOC - BEQUALM banner until 2015.

Since 2016, the programme BEQUALM no longer exist and the intercomparison exercise has changed its name to IPI (International Phytoplankton Intercomparison) with the continued collaboration of the IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae and in association with NMBAQC in the UK.

In 2018, we have developed a website www.iphyi.org as a point source of information about the IPI scheme. Information about the exercise can be obtained in this website under the heading 'Programme' and register your laboratory under 'Registration'. The site is under development and improvement and we are hoping to be able to provide all documentation through the website in the future. Also, you can find information about the scheme through our partners, the IOC (<http://hab.ioc-unesco.org> under the heading 'activities and training courses') and associates in the NMBAQC website (www.nmbaqcs.org) under scheme components and phytoplankton, you'll find information on the current timetable schedule for the exercise, the list of participants, previous reports and the workshop agenda from the previous exercises to give you an idea of the range of activities within this intercomparison exercise. There is also information of the other NMBAQC schemes.

The purpose of this exercise is to compare and evaluate the performance of testing laboratories and to monitor the laboratories continuing performance over time on the composition and abundance of marine microalgae in preserved marine samples. We work mainly with laboratories engaged in national official/non-official phytoplankton monitoring programmes, water framework directive, marine strategy framework directive and others (environmental agencies, consultancies, private companies) working in the

area of analysis of water samples for marine phytoplankton. Phytoplankton analysts should participate annually in an external and independent proficiency testing scheme to test their ongoing competency on the abundance and composition of marine Phytoplankton.

The Marine Institute is accredited to ISO 17025 for toxic marine phytoplankton abundance and composition since 2005 and recognises that regular quality control assessments are crucial to ensure a high quality output of phytoplankton data. We are programmed to apply for the accreditation of this Proficiency Testing scheme under ISO 17043 for 2019. All our work is carried out following the technical and managerial requirements for PT schemes (ISO17043:2010) and the data is statistically analysed using the statistical methods as laid out in ISO13528:2015 'Statistical methods for use in PT by interlaboratory comparisons'. We use the statistical database software ProLab Plus from QuoData to do the statistical evaluation of the participants' data.

Participants are asked to carry out microscopic analysis on three marine water samples spiked with cultured material and preserved with neutral lugol's iodine and return results on the composition of the samples to the highest possible taxon and the average abundance in cells per litre for each species in each sample.

In 2018 for the first time, we have changed the way we prepare the samples for this intercomparison. These changes will have implications in the way participants must prepare their samples for analysis, so read carefully the following notes.

In previous years, we have prepared a '**master mix**' by mixing manually using the Paul-Schatz rotation (figure of eight movement) a Schott glass bottle containing the species of interest. Then, a 5ml aliquot from this manually homogenised '**master mix**' was pipette into each pre-prepared sterilin tube containing an accurate volume of sterile seawater + lugol's iodine (45ml).

This year for the first time we have moved towards an automated homogenizer. We are using an Inversina 2L tumbler mixer by Bioengineering to homogenize the Master mix (see video https://youtu.be/LTQ_mzolXIU). This, we are hoping will be an improvement towards a better homogenization of the samples.

We have also changed to an automated multi-pipettor (Xstream, eppendorf) to deliver the aliquots with accuracy and we are using for the first time brown glass ampoules to store our samples.

These changes mean that a bit of preparation will be necessary by the participants prior to analysis. The advantages are many, samples are really stable over long periods of time and the organisms preserve better and they look even better under these conditions. Samples can be sent at different times to laboratories so there is no need for a huge courier dispatch across the world and also the deadlines don't have to be so tight for laboratories to analyse the samples.

Degradation of the samples is practically zero over 12 months. We don't have enough data after this as yet, but the batch we prepared last year in May doesn't show signs of deterioration.



Figure 1: Sample set per participant including sealed vials, lugol's iodine, plastic droppers and 50ml sterilin tubes.

Please adhere to the following instructions strictly and note that these instructions are specific to this ring test only.

2. Deadlines, checklists and forms

Upon receipt of the samples, every analyst must make sure that they have received everything listed in the checklist confirmation form (Form 1) and according to figure 1. Make sure that all the samples are intact and sealed properly and check that you have received the enumeration and identification results log sheet (Form 2) as an Excel workbook.

Please complete form 1: checklist confirmation form and send it back to me by fax to (+353 91 387201) or scan it as a pdf file and send it to me via e-mail to rafael.salas@marine.ie . If you send the form via e-mail, please name the file as Form 1 followed by the exercise code and your full name **i.e. Form 1: IPI18 Rafael Salas**. This validates the traceability of the samples from origin to the laboratories and that all materials have arrived into the testing laboratories to the analysts in good working condition.

Once samples have been receipt by the testing laboratories, analysts have until the **28th September 2018** to return the results to the scheme co-ordinator at rafael.salas@marine.ie or fax (+353 91 387201) or post to Rafael Salas, Marine Institute, Phytoplankton laboratory, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland. If you decide to post your results, make sure first to make a copy of them and then send the originals to the address above. The enumeration and identification results log sheet (Form 2) **must be received** in the Marine Institute by **Friday, September 28th 2018**.

Please note: Results received after this date will not be included in the final report. Also, if you are posting your results make sure to make a copy for your records before sending the originals, just in case they don't arrive.

Form 2 is an Excel workbook named 'Enumeration and identification logsheet' for analysts to input their results. At the top of the form, first fill in your name, analyst and laboratory code. Fill in all the information relevant to the analysis of your samples, for example the settlement date, chamber volume used in 'mls', the analysis date and the sample number in the corresponding cells.

Under the column 'organism' a drop down menu appears with a list of possible species names. You must choose from this list your answers. The list of species is a reduced list and is designed to have more entries than species are in the samples, you must choose which ones you think have been inoculated in the samples and provide a cell count. If is not in the list, is not in the sample.

The number of rows under the column name 'organism' is arbitrary and independent of the number of species in the samples. There are 14 rows but this doesn't necessarily mean that you need to enter 14 names or that there are 14 species in the samples. The number and type of species inoculated in the samples is different from year to year.

In the comments box, you can write information about the test method you used, any deviation from the Utermöhl test method and how you performed your calculations if you think is necessary.

Once you have completed your samples and have reviewed your calculations in form 2, please send your form 2 back to me by fax to (+353 91 387201) or scan, pdf and send it via e-mail to rafael.salas@marine.ie . If you send the form via e-mail, please name the file as Form 2 followed by the exercise code and your full name **i.e. Form 2: IPI18 Rafael Salas.**

3. Test method

The Utermöhl cell counting method (Utermöhl 1931, 1958) is the standard quantitative and qualitative test method used in the Marine Institute phytoplankton national monitoring programme in Ireland. We use 25ml volume sedimentation chambers and we are accredited under ISO 17025 quality standard.

We advise the use of 25ml sedimentation chambers for the purpose of this intercomparison exercise if these are available. If not, other sub-sample volumes and/or chambers may be used. If a different method is used, please state all this information in your results.

4. Equipment

The following are the equipment requirements to complete this exercise:

Sedimentation chambers (25ml volume if possible but other volume chambers can be used).

Inverted Microscope: This should be equipped with long distance working lenses up to 40 x objective or higher and condenser of Numerical Aperture (NA) of 0.3 or similar and capable for bright field microscopy. Other types of reflected or transmitted light capabilities may be helpful depending on the type of organisms in the samples and can be used if required.

Tally counters

5. Sedimentation chambers and sample preparation

Sedimentation chambers consist of a clear plastic cylinder, a metal plate, a glass disposable cover-slip base plate and a glass cover plate (Fig 2). Three sedimentation chambers are required.

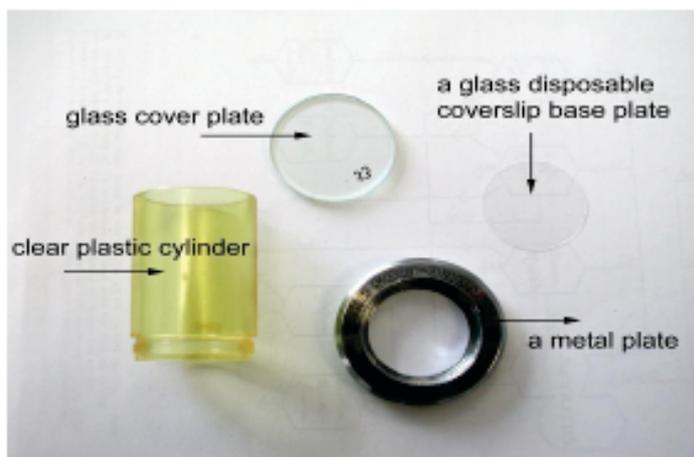


Fig 2: Sedimentation counting chamber

- 5.1 **Storage of ampoules:** If you are not analysing the samples straightaway or if you are analysing them in different dates, please ensure the samples are kept in a fridge at 2-5°C away from direct sunlight and in an upright position.

5.2 **Temperature adaptation:** Vials must be adapted to room temperature before aliquoting and sedimentation takes place. This reduces the risk of air bubbles inside the sedimentation chambers due to temperature differences between room and sample.

5.3 **Chamber preparation:**

5.3.1 All sedimentation chambers should be cleaned before you start

5.3.2 Place a new 'not used before' disposable cover slip base plate inside a cleaned metal plate.

5.3.3 Screw the plastic cylinder into the metal plate until tight. Extra care should be taken when setting up chambers. Disposable cover slip base plates are fragile and break easily causing cuts and grazes.

5.3.4 Once the chamber is set up, it should be tested for the possibility of leaks by filling the completed chamber with sterile filtered seawater and allowing it to rest for a few minutes. If no leakage occurs, pour out the water, dry out completely and proceed with the next step.

5.4 **Sample homogenisation and filling:**

5.4.1 To set up a sample for analysis, firmly invert the sample at least 50 times before pouring the sample to ensure that the contents are homogenised properly. Avoid hard shaking of the samples

5.4.2 Place the chamber in a flat horizontal surface protected from vibration and strong sunlight and gently pour the sample into the counting chamber to the top. Cover the chamber with the glass plate to complete the vacuum, making sure that there are no air bubbles or pockets between the sample and the cover glass.

5.4.3 Label the sedimentation chamber with the sample number from the ampoule.

5.5 **Preparation of samples for analysis from ampoules:**

5.5.1 In 2018, as explained in the introduction, the production of the materials has been modified from previous tests. This year we have used 10ml amber glass ampoules containing 100µl of lugols iodine and 3ml aliquots of the Master mix, gas purged, sealed and stored at 2-5 degree Celsius in the dark.

5.5.2 In order to prepare the ampoules for analysis, analysts must aliquot the contents into the 50ml sterilin tubes, using the plastic droppers included in the sample kit.

5.5.3 Please follow the link here to watch a video on how to prepare your sample for analysis from an ampoule. <https://youtu.be/UXhgblsp3w>

5.5.4 The sterilin tubes should be prepared in advance of opening the ampoule.

5.5.5 Measure accurately 47ml of sterile seawater containing a few drops of lugol's iodine. The ampoules are already preserved in lugols, but when the sample is aliquot into the tube, it is going to be diluted and pale in colour, so if you wish your sample to have a slightly darker coloration you can add a few drops of lugols iodine to the sterile seawater before you pipette the amount.

5.5.6 The volume can be measured in different ways, using an accurate pipette is one way to do it. However, you can use a gravimetric method also by weighing the amount using a balance. If you use a gravimetric method, remember that the density of Seawater at 33-35ppt is roughly 1.025g, so that 47ml = 48.175g in weight.

5.5.7 The seawater used should be of a salinity of 33-35ppt

- 5.5.8 Once your tubes contain the 47ml seawater and are ready, then you can start working with the ampoules.
- 5.5.9 First adapt the ampoule and test tube temperature to room temperature, before aliquoting.
- 5.5.10 Make sure the ampoule contents are at the bottom of the ampoule. If some contents are trapped on the top, flick the ampoule using your fingers to dislodge any liquid.
- 5.5.11 Break the ampoule by the neck pre-marked break line using gloves and a wad of paper to avoid cuts and grazes. Avoid losing any sample content. If you think some content is lost, you have an extra sample to work with and if this fails, ask for another set.
- 5.5.12 Use one dropper per sample, do not mix or use the same dropper. Using the dropper, aspirate the contents from the ampoule into the tube.
- 5.5.13 Once all the sample has been aliquoted into the tube, using the same dropper, take a 3ml sample from the tube itself and rinse the ampoule with it once, collect the liquid again back into the tube.
- 5.5.14 Close the lid of the tube, invert the sample 50 times minimum and pour into a sedimentation chamber of your choice.
- 5.5.15 Once the sample has been taken out of the ampoule into the tube, the sample should be sedimented and analysed. **Do not keep the sample in the tube for several days as this will invalidate your analysis.**

5.6 **Sedimentation time:**

- 5.6.1 Settling time is dependent on the height of the chamber. 10ml chambers should be allowed to settle for a minimum of 8 hours, 25ml chambers for a minimum of 12 hours and 50ml chamber for a minimum of 24 hours.
- 5.6.2 Set the chamber on the inverted microscope and start the analysis.

6. Counting Procedure and strategy

- 6.1 Scan the entire chamber at low magnification first to get an initial overview of the density, distribution and composition of phytoplankton in the samples.
- 6.2 Assess the random distribution pattern of the organisms in the sample before starting the analysis. Larger organisms tend to sediment towards the edges and smaller ones towards the centre if the temperature of the chamber is higher than the sample and vice-versa if the temperature of the chamber is lower than the sample. A visual inspection is enough to assess these patterns.
- 6.3 If the sample is not randomly distributed, then the sample will have to be returned to its original container and settled again after a period of acclimatization. This is particularly important if other counting strategies are to be used in some organisms other than the whole chamber count, in which case, the sample count wouldn't be affected.
- 6.4 Make a preliminary list of species and densities to help you choose the best counting strategy for the sample.
- 6.5 Choose the correct organism/s from the dropdown species list in the Excel worksheet Form 2.
- 6.6 Start at the lower magnification to count the larger species if present, depending on size even x 4 or x 10 objectives could be used. Then, go over the sample again at higher magnifications to count the rest of the species.
- 6.7 The smaller species should be counted at a higher objective magnification (x 20) or x 40 if necessary.
- 6.8 Each analyst should carry out a whole chamber cell count (WC) where possible of all the species identified in the samples.

- 6.9 Other counting strategies can also be used where the cell density in the sample for a particular organism is high. Show your calculations if using a half chamber (HC), field of view (FV) or transect (Tr) counting strategy.
- 6.10 If half of the chamber is to be counted, analyse every second transect.
- 6.11 If a transect counting strategy is used for one or several organism, count at least three transects and average your results. Be consistent as to which cells lying on which borders are to be counted or omitted.
- 6.12 Fields of view should be avoided if possible but if you need to use this counting strategy, count at least ten different randomly selected fields and average your results.

7. Samples

Analysts must analyse three samples in total to complete this part of the exercise. The samples are replicates. A fourth sample is additional and should be used as a replacement in case of one sample leaking or breaking. All the samples are made up in sterile filtered Seawater and spiked with culture material consisting of several species. Participants are asked to carry out a whole sedimentation chamber cell counts (where possible ; see section 6.) on each organism and sample.

The Master mix, have been made up with different aliquots of cell cultures at different concentrations and estimates have been carried out in 1ml lugol's preserved samples and counted in Sedgewick-Rafter chambers for each species. This is done to check the condition and the densities of the cultures prior to inoculating into the Master mix.

Once the master mix have been made up in a 2L brown schott glass bottle with the target species at the required concentrations, this mixture has been homogenised using an automated tumbler mixer (Inversina 2L) that uses the Paul-Schatz movement for 4 minutes at 60 rpm approximately and divided in 4 x 500ml batches. These in turn have been homogenised again at the same speed and time. 3mls of the Master mix have been inoculated using an automated multi-pipette eppendorf into a batch of 600 10ml brown glass ampoules, containing 100µl of lugols iodine.

The ampoules have been purged using nitrogen gas and sealed using a torch and tongs. The ampoules have been checked for leaks by submerging on a water bath and then stored at 2-5°C in the dark. The ampoules have been assigned a number randomly.

Each analyst must **count and identify all phytoplankton species** found in the samples.

8. Counting guide IPI2018

- 8.1 It is very important to spend some time becoming familiar with the samples and how the cells appear on the base plate before any count is carried out.
- 8.2 Figures 3 to 5 show a series of images of chain forming diatoms to demonstrate how they should be counted.

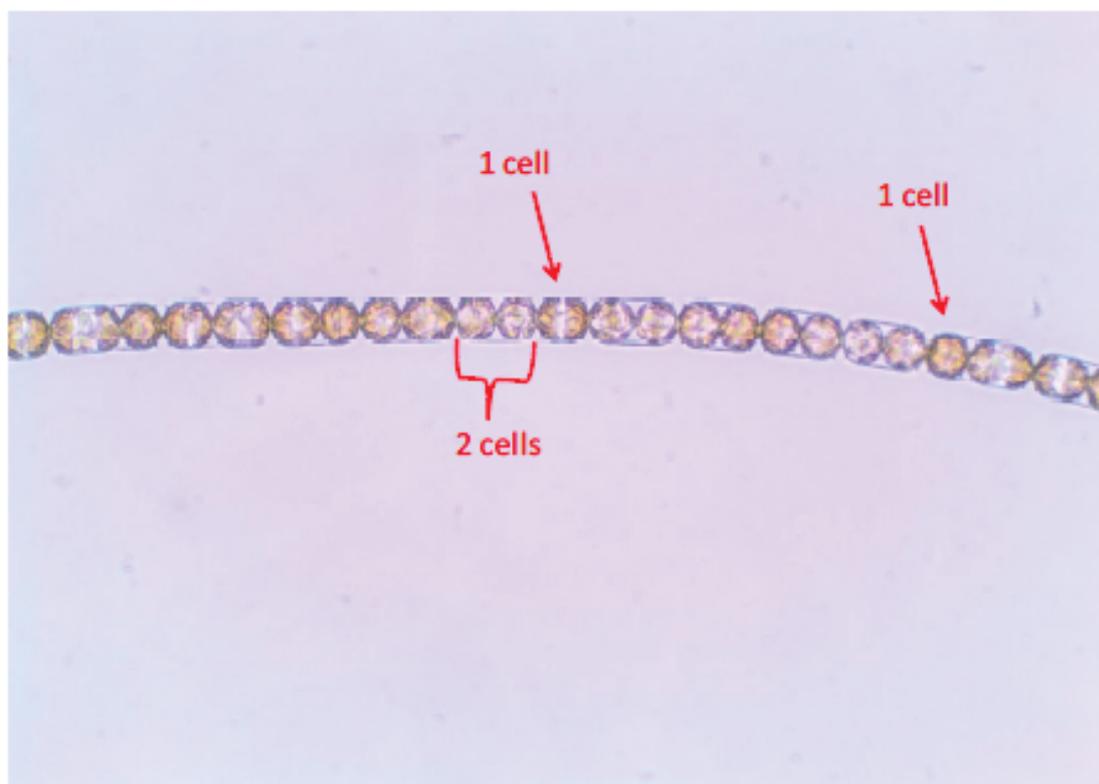


Fig.3 Chain forming diatom showing couplets united by their cingula and also single cells. Count as in the image.

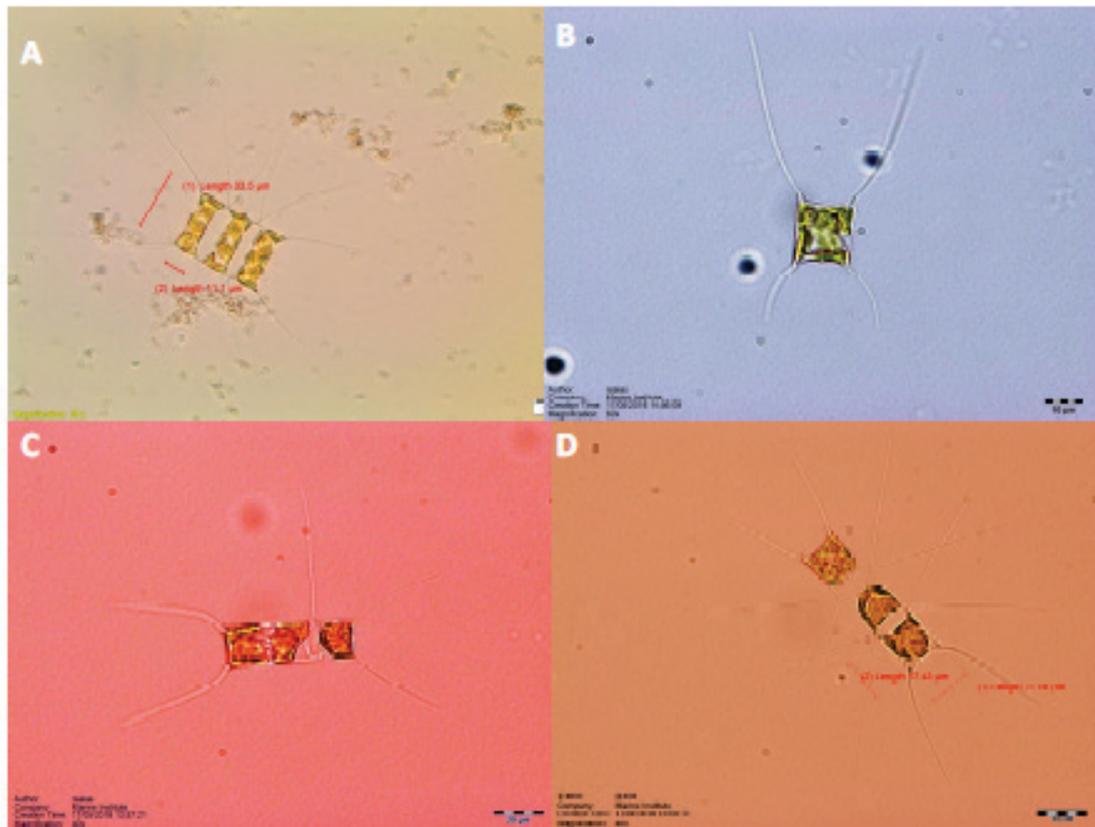


Fig.4 Chain forming diatom images (A-D). Different cell size (A). Single cells (B). Cells dividing (C) (count 2 cells). Normal cell chain (D). If you see different size chains (as in A), do not count as a different species. We cannot ascertain fully whether image A belongs to a different species (contaminant in the culture) or is actually the same species, for the purpose of this test, please count them all as if they were the same species if you see them in your samples. Identify to species level if possible using (B-D) as the type species.

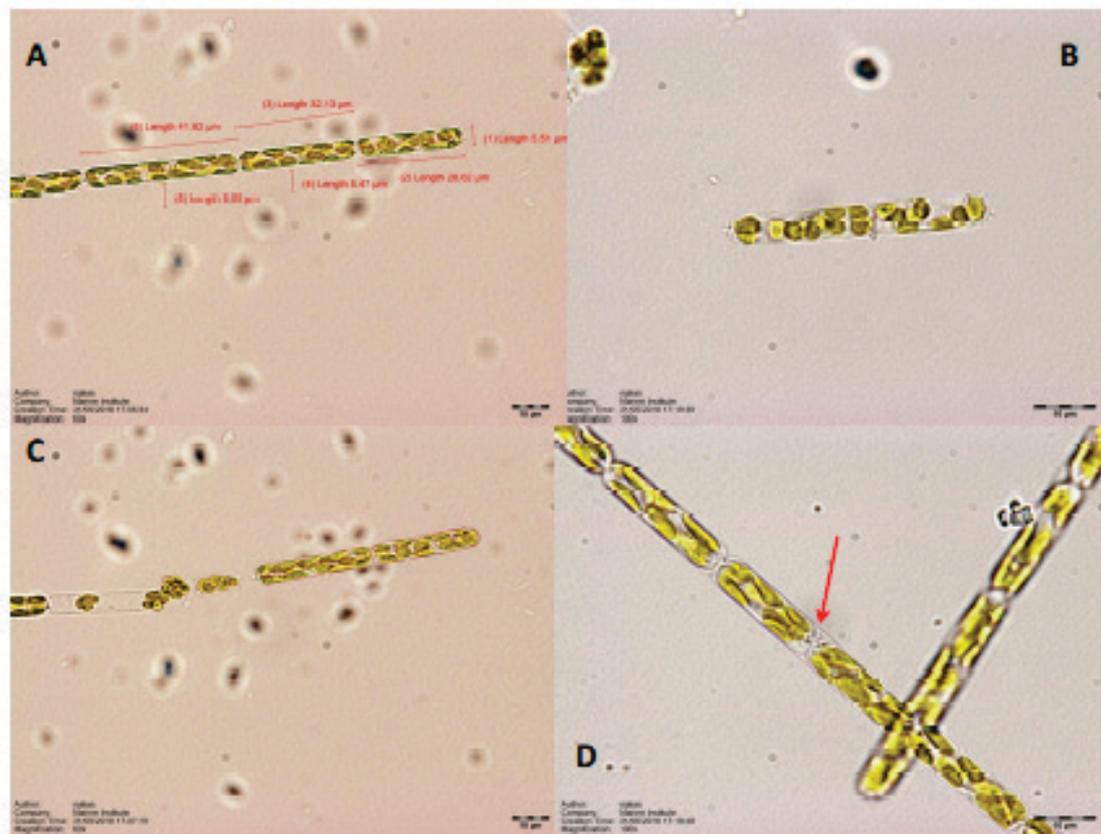


Fig.5 Another chain forming diatom. Please be aware that cells may have different lengths (A), there are single cells (B), broken cells do not count as in C and be careful with divided cells (see arrow in image D) where cells are divided but within the cingula (count 2 cells in this case).

8.3 How to count dinoflagellates?

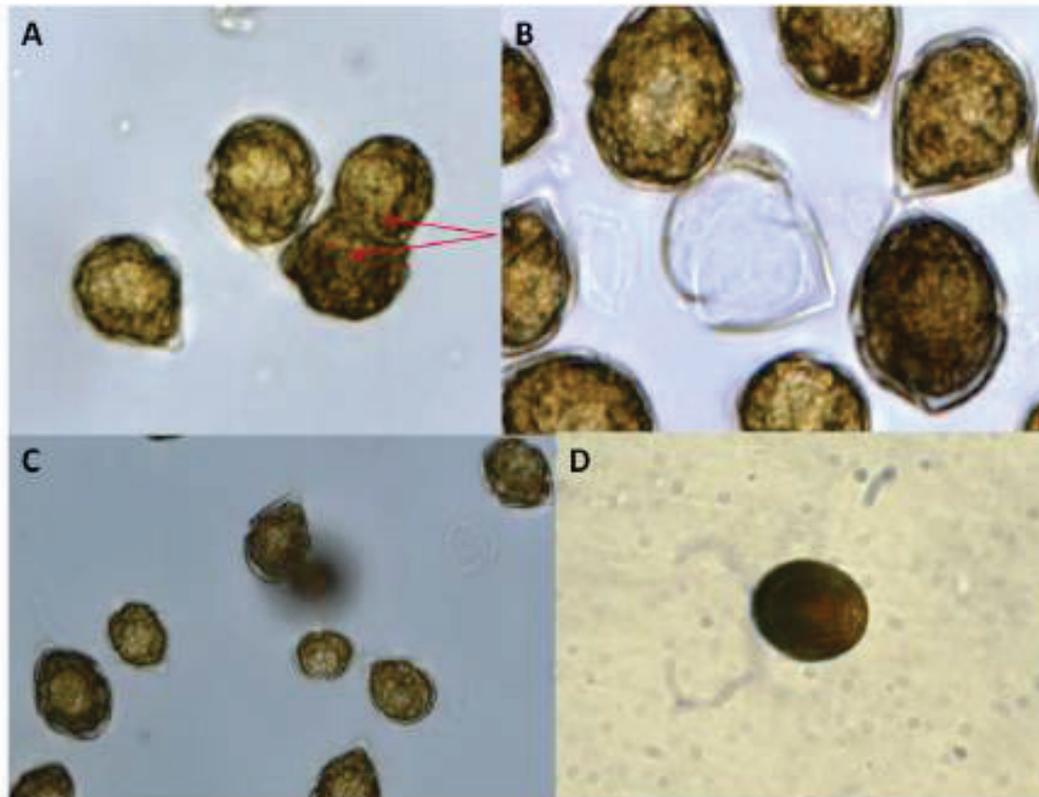


Fig.6 Image A shows two cells fusing or dividing, count only one cell. B: Dinoflagellates empty theca should not be counted. C: Cells may also vary in size, some cells will appear smaller than others, this is normal in culture conditions. Count all cells big or small. D: Sometimes Plasmolysis may occur and the cells appear naked and rounded. Do not count plasmolysed cells as we don't know what they are.

These rules are applicable to this intercomparison exercise only.

9. Online HABs taxonomic assessment in Oceanteacher

A HAB taxonomic assessment has been developed in the web platform 'Ocean teacher' and it should be ready by the **13th of July 2018**. All participants will need access to the internet to complete this part of the exercise.

This year, we are going to manually enroll the participants to the test using the e-mails you have provided us from the registration process, so there is no need for any of you to register. Once we have you all registered, we will give you access to the test.

The test will be open from the **13th of July 2018** until the **19th October 2018**, giving you ample time to complete the exercise.

Once we have you enrolled, an e-mail will be sent to you with instructions on how to access the test. In order to access the exercise you need to go to the webpage <http://classroom.oceanteacher.org/> and login.

When you go to the page <http://classroom.oceanteacher.org/> in the top right hand corner of this page, you'll see a link to login. Press login and use your username and password to access the course, if you forgot your password press the forgotten password link. Once you are logged in, in the main page go to my courses and in the drop down menu choose the IPI 2018 course and start your test. Please note that you can login and out as many times as you want from the exercise as long as you don't submit the exercise, So do not press submit until you are sure you are finished.

Analysts will have only one attempt to the exercise and once the exercise is submitted analysts won't be able to access it again to make any changes. So, make sure you review all your answers before submitting. There are a number questions and a maximum grade of 100% for a perfect score. All questions have the same score.

There are different types of questions (true/false, numerical, matching, multiple choice short answer, etc..). Please note that if you are asked for a number as the answer do not use text, use a numerical value. Also, in questions where you are asked to write the answer, please make sure that the grammar is correct. Incorrect grammar will give an incorrect answer. Please review your work carefully before submitting.

Résultats bruts de chaque réplique en nombre de cellules par litre.

CODE Labo-Analyst	Dactyliosolen fragilissimus			Heterocapsa triquetra			Amphidinium carterae			Thalassiosira rotula/gravida			Pseudo-nitzschia delicatissima complex		
A-33	22760	19360	15040	19400	14640	24880	18120	7520	10680	5000	5680	4400	2120	920	2360
A-8	17700	14200	22050	15850	11840	15300	5750	9720	6400	5350	4560	5800	1350	2120	1800
A-9	21920	13520	19600	22400	15760	17120	26160	10080	16880	6240	5200	5200	2240	2080	3280
B-10	10800	29960	15960	10360	18520	9720	5520	5360	3120	4400	7720	3720	840	3720	1440
B-4	21120	21280	19880	14760	14080	14320	5120	6680	5920	4800	5480	4080	2400	1440	1320
B-71	22280	25920	23360	14040	15880	15120	7400	13000	9800	5240	6080	4400	2760	2720	2880
C-17	38800	28700	28500	35200	21000	24400	13200	3100	3400	4400	5000	4900	4400	3000	4200
C-93	31200	31300	26800	26000	31200	25700	15300	29900	22900	5400	5600	5000	4400	6700	3600
D-13	14560	16240	20400	16800	16480	19760	12560	15520	13040	5520	4480	4840	1440	1760	2200
D-22	17880	10480	17560	15840	13680	16360	9160	7520	8320	5880	3600	4000	2360	1400	2040
E-1	23550	27850	24100	21000	25850	29100	9900	20550	13200	5500	5200	5600	2800	4350	3100
E-18	24950	25150	18400	18750	30700	22950	12350	13250	10450	5650	5700	5500	2650	3500	3200
E-58	25800	19150	22300	20450	22800	30700	11850	10350	15850	5150	5450	5550	3150	3500	3400
F-15	30960	17280	23920	17040	26000	20560	7840	11280	13920	4960	4240	4240	3680	3200	3760
F-56	31320	20120	30680	16840	15320	20320	7720	6160	18960	5400	5480	4920	3480	3520	3440
G-61	33800	34600	26600	10500	18000	8200	15500	15600	2600	6400	5500	5800	3700	3700	2800
H-5	18960	23560	23000	19320	19960	25480	3640	18400	20960	5240	5400	5040	2280	3560	2200
H-75	26960	26520	27200	23640	22600	22840	18120	19960	19760	4560	4200	5920	2560	2440	2280
I-11	19250	30400	31250	7700	8600	5800	1300	1250	1100	5150	6500	5850	1700	2050	3300
J-77	30240	28360	22600	15120	11160	9520	16240	8840	6720	3880	4440	3080	1800	2920	2080
J-14	16640			6560			4640			2480			2160		

CODE Labo-Analyst	Chaetoceros lorenzianus			Karenia mikimotoi			Levanderina fissa			Prorocentrum micans			Melosira nummuloides		
A-33	2960	1760	1000	7200	5600	4800	1600	1160	1440	3880	1680	2440	3120	1000	640
A-8	2900	2320	2200	2950	3600	3000	1250	1520	1200	3450	2280	2200	2200	2680	3250
A-9	4240	2560	3520	6480	1120	3520	1400	400	720	3520	1840	3200	4240	800	2240
B-10	1200	3040	2120	2120	2160	2320	1240	1480	1520	1680	3800	1600	920	1600	680
B-4	1840	2600	2600	2520	2240	2120	1240	1120	1040	2400	1960	1840	1720	1800	680
B-71	2040	3160	3600	2480	2320	2280	1200	1240	1080	2560	1920	1840	2160	2160	840
C-17	6500	3500	3300	4500	1300	1000	13900	1900	1500	6100	1900	2800	9200	6200	2700
C-93	4400	4700	6700	5300	11800	7000	1900	12200	1500	3500	8200	2700	2200	5300	4800
D-13	2600	3360	3840	1400	4360	2840	1240	680	1080	1720	1840	2120	1480	1640	3080
D-22	3120	3400	3240	1880	3720	2120	200	120	520	1520	1520	1840	1480	1600	1960
E-1	3150	4750	3700	6500	6800	4100	1100	1000	850	2050	3300	3650	1900	4750	4150
E-18	3600	4650	3700	5050	7100	3550	1000	2600	850	2000	4500	3650	1950	1800	4100
E-58	3400	3350	4950	4650	3300	6000	900	950	2000	1900	3500	4550	1800	4200	1800
F-15	3920	4400	3840	2800	4800	5280	1520	2000	1360	1920	3680	2880	1640	2560	1560
F-56	3560	3680	4040	3080	2880	5240	1480	560	1480	1720	1800	3160	1480	2480	1560
G-61	2900	4900	2600	1500	1900	1200	1400	1800	600	1300	1000	600	200	1400	1500
H-5	2800	3280	3880	3240	7960	10040	1080	960	1200	5680	3560	4120	1440	1680	1800
H-75	2680	4160	4080	1040	720	1240	7160	9240	9320	4080	3560	3600	2760	2040	2080
I-11	2000	1450	2150	300	700	400	1400	900	350	1200	1150	650	2550	1150	2650
J-77	2880	3360	2600	3360	1360	1640	920	480	480	1600	800	1120	1560	2200	600
J-14	1800			1000			400			760			880		

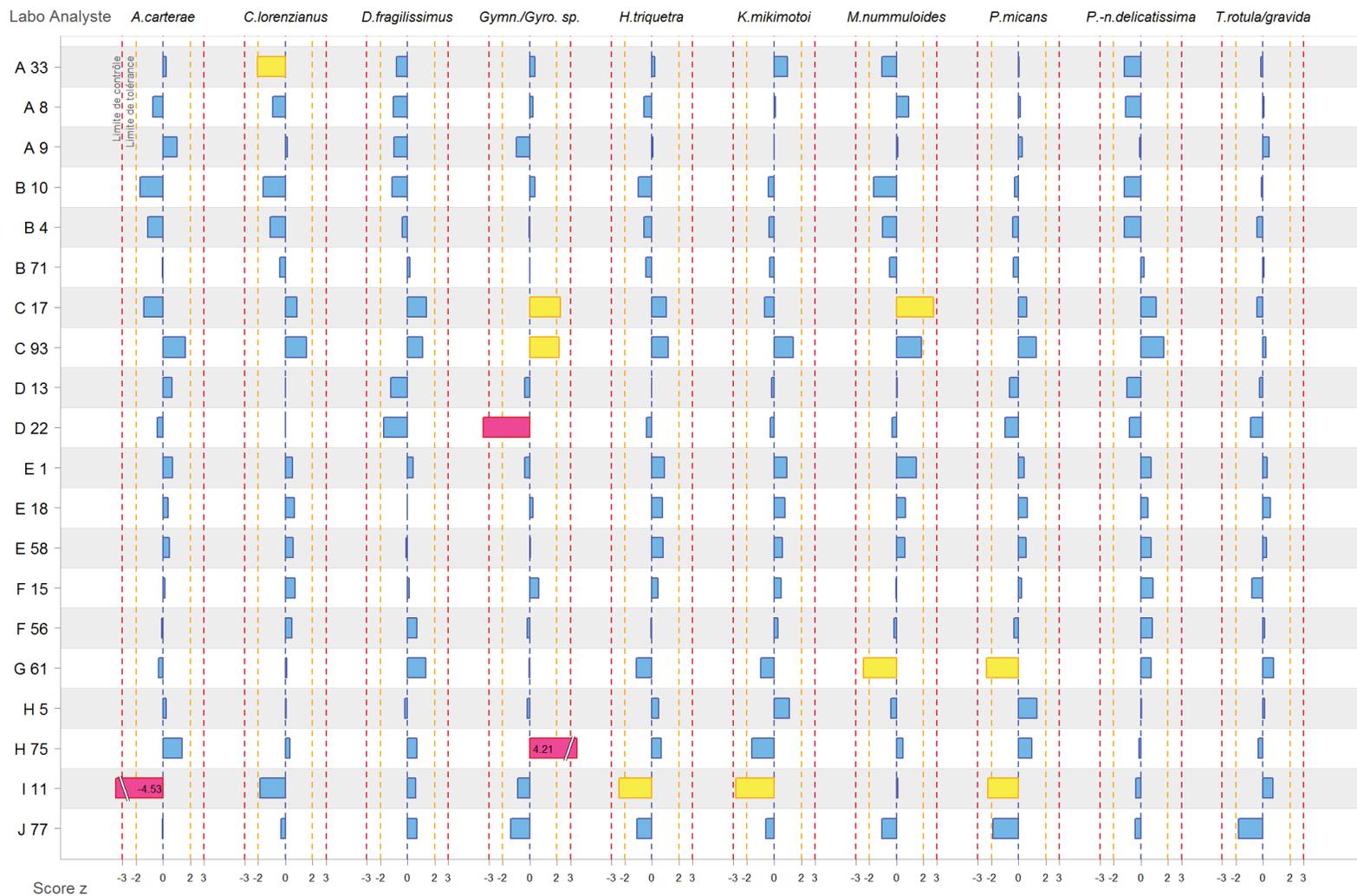
Résultats traités (moyennes des Log10 de chaque réplique et z score de cette moyenne) sans les résultats de l'analyste J-14

CODE Labo-Analyste	Amphidinium carterae		Chaetoceros lorenzianus		Dactyliosolen fragilissimus		Gymnodinium/ Gyrodinium sp.		Heterocapasa triquetra	
	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score
A-33	4.054	0.250	3.239	-2.057	4.274	-0.798	3.142	0.375	4.283	0.212
A-8	3.851	-0.751	3.390	-0.908	4.248	-1.047	3.119	0.263	4.153	-0.600
A-9	4.216	1.048	3.527	0.135	4.255	-0.981	2.869	-0.957	4.260	0.071
B-10	3.655	-1.718	3.296	-1.622	4.238	-1.145	3.149	0.405	4.090	-0.988
B-4	3.769	-1.157	3.365	-1.100	4.317	-0.381	3.053	-0.058	4.158	-0.567
B-71	3.991	-0.060	3.455	-0.413	4.377	0.193	3.069	0.017	4.176	-0.455
C-17	3.714	-1.425	3.625	0.878	4.501	1.385	3.533	2.275	4.419	1.056
C-93	4.340	1.659	3.714	1.552	4.473	1.116	3.514	2.183	4.440	1.187
D-13	4.135	0.648	3.509	-0.008	4.228	-1.240	2.986	-0.383	4.246	-0.019
D-22	3.919	-0.415	3.512	0.019	4.172	-1.773	2.365	-3.406	4.183	-0.410
E-1	4.143	0.687	3.581	0.543	4.400	0.414	2.990	-0.365	4.400	0.937
E-18	4.078	0.365	3.597	0.667	4.354	-0.024	3.115	0.241	4.374	0.776
E-58	4.096	0.457	3.584	0.563	4.347	-0.089	3.078	0.061	4.385	0.848
F-15	4.030	0.131	3.607	0.740	4.369	0.119	3.205	0.683	4.320	0.441
F-56	3.985	-0.091	3.575	0.494	4.429	0.694	3.030	-0.173	4.240	-0.057
G-61	3.933	-0.349	3.523	0.098	4.498	1.357	3.060	-0.026	4.063	-1.155
H-5	4.049	0.225	3.517	0.058	4.337	-0.187	3.032	-0.163	4.331	0.509
H-75	4.285	1.386	3.553	0.327	4.430	0.703	3.930	4.209	4.362	0.704
I-11	3.084	-4.533	3.265	-1.859	4.421	0.617	2.881	-0.894	3.861	-2.412
J-77	3.995	-0.043	3.467	-0.325	4.429	0.698	2.775	-1.410	4.069	-1.123
Ecart-type de référence $\hat{\sigma}_s$	0.179		0.104		0.104		0.133		0.146	
$\hat{\sigma}'_s = \sqrt{(\hat{\sigma}_s)^2 + (s_s)^2}$	0.203		0.132		Non utilisé		0.205		0.161	
Moyenne de référence Xs	4.004		3.510		4.357		3.065		4.249	

Résultats traités (moyennes des Log10 de chaque réplique et z score de cette moyenne) sans les résultats de l'analyste J-14n (suite)

CODE Labo-Analyste	Karenia mikimotoi		Melosira nummuloïdes		Prorocentrum micans		Pseudo-nitzschia delicatissima complex		Thalassiosira rotula/gravida	
	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score
A-33	3.762	0.992	3.100	-1.063	3.401	0.049	3.221	-1.196	3.699	-0.149
A-8	3.501	0.106	3.427	0.910	3.413	0.117	3.237	-1.091	3.717	0.093
A-9	3.469	-0.002	3.294	0.103	3.439	0.261	3.395	-0.080	3.742	0.437
B-10	3.342	-0.433	3.000	-1.666	3.336	-0.305	3.218	-1.217	3.701	-0.128
B-4	3.359	-0.375	3.108	-1.017	3.312	-0.437	3.220	-1.204	3.677	-0.446
B-71	3.373	-0.329	3.198	-0.475	3.319	-0.402	3.445	0.243	3.716	0.075
C-17	3.256	-0.726	3.729	2.728	3.504	0.620	3.581	1.119	3.678	-0.438
C-93	3.880	1.393	3.583	1.845	3.630	1.316	3.675	1.723	3.727	0.222
D-13	3.413	-0.193	3.291	0.088	3.276	-0.641	3.249	-1.018	3.693	-0.234
D-22	3.390	-0.269	3.222	-0.327	3.210	-1.006	3.276	-0.841	3.643	-0.909
E-1	3.753	0.960	3.524	1.494	3.464	0.401	3.526	0.761	3.735	0.335
E-18	3.702	0.786	3.386	0.660	3.506	0.629	3.491	0.538	3.749	0.531
E-58	3.655	0.627	3.378	0.611	3.494	0.564	3.525	0.755	3.731	0.281
F-15	3.617	0.499	3.272	-0.027	3.436	0.246	3.549	0.910	3.650	-0.808
F-56	3.556	0.292	3.253	-0.144	3.330	-0.339	3.542	0.864	3.721	0.149
G-61	3.178	-0.989	2.874	-2.423	2.964	-2.362	3.528	0.775	3.770	0.808
H-5	3.804	1.135	3.213	-0.383	3.640	1.374	3.417	0.065	3.718	0.108
H-75	2.989	-1.630	3.356	0.480	3.573	1.001	3.385	-0.145	3.685	-0.339
I-11	2.641	-2.809	3.297	0.122	2.984	-2.250	3.354	-0.344	3.764	0.727
J-77	3.292	-0.604	3.105	-1.036	3.052	-1.875	3.346	-0.391	3.575	-1.821
Ecart-type de référence $\hat{\sigma}_s$	0.269		0.166		0.157		0.156		0.038	
$\hat{\sigma}'_s = \sqrt{(\hat{\sigma}_s)^2 + (s_s)^2}$	0.295		NA		0.181		NA		0.074	
Moyenne de référence x_s	3.470		3.277		3.392		3.407		3.710	

ANNEXE IV Résumé des z scores de tous les analystes



*Responsables et analystes participants des Laboratoires
Ifremer Environnement Ressources de :*

- Boulogne sur mer (LER-BL)
- Port en Bessin (LER-N)
- Dinard (LER-BN)
- Concarneau/Brest (LER-BO - Br)
- Lorient (LER-MPL/LO)
- Nantes (LER-MPL/NT)
- L'Houmeau/La Rochelle (LER-PC/LR)
- Arcachon (LER-AR)
- Toulon (LER-PAC/TL)

Responsables nationaux :

- Coordinatrice du REPHY
- Responsable de l'Unité Littoral
- Directeur de Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes