

**Guide révisé pour les protocoles de tri des
échantillons et de sous-échantillonnage dans les
études de ESEE portant sur les communautés
d'invertébrés benthiques**

**Bureau national de suivi des effets sur l'environnement
Institut national de la recherche sur les eaux
Environnement Canada
Décembre 2002**

Table des matières

1.0 INTRODUCTION.....	1
2. 0 MÉTHODES DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS.....	1
3.0 MÉTHODES DE SOUS-ÉCHANTILLONNAGE EN LABORATOIRE	9
3.1 QUAND SOUS-ÉCHANTILLONNER	9
3.2 RECOMMANDATIONS POUR LE SOUS-ÉCHANTILLONNAGE DANS LES PROGRAMMES DE ESEE.....	9
3.3 MÉTHODES DE BASE POUR LE SOUS-ÉCHANTILLONNAGE EN LABORATOIRE	15
3.4 CALCUL DES FACTEURS DE CORRECTION, DE LA PRÉCISION ET DE LA JUSTESSE POUR LE SOUS-ÉCHANTILLONNAGE	18
4. 0 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	21
ANNEXE A.....	25

1.0 Introduction

Les guides préparés pour les programmes ESEE tant pour les pâtes et papiers que les mines de métaux fournissent des recommandations pour le traitement des échantillons en laboratoire, les protocoles de sous-échantillonnage et l'assurance de qualité. Cependant, il manquait les protocoles détaillés et les critères d'acceptabilité pour le sous-échantillonnage. Pour déterminer s'il existe des difficultés potentielles de traitement ou de sous-échantillonnage dans le programme d'ESEE, on a procédé à un examen détaillé des rapports d'interprétation du programme d'ESEE des fabriques de pâtes et papiers du cycle 2 (Annexe A). L'information extraite de ces rapports comprenait les éléments suivants : nombre d'études où un sous-échantillonnage en laboratoire a été effectué; type de sous-échantillonnage; disposait-on de protocoles détaillés; les facteurs de correction de la densité étaient-ils indiqués et calculés de façon appropriée; l'erreur de sous-échantillonnage (précision et [ou] justesse) a-t-elle été indiquée et calculée correctement; enfin, les critères d'AQ/CQ pour le tri et le sous-échantillonnage ont-ils été établis et respectés dans le cadre de ces études. Le guide révisé et les recommandations données dans le présent document sont le résultat du manque de cohérence de la présentation, dans ces rapports, de l'information d'AQ/CQ pour le tri et le sous-échantillonnage (pour plus de détails, voir le document d'examen du cycle 2). Le but du présent guide révisé n'est pas de réinventer les protocoles établis, mais de fournir davantage de détails dans les guides techniques existants, notamment en ce qui concerne les sections 6.2.2 du guide technique pour les PP et 5.2.2 du guide technique pour les MM.

2. 0 Méthodes de traitement des échantillons

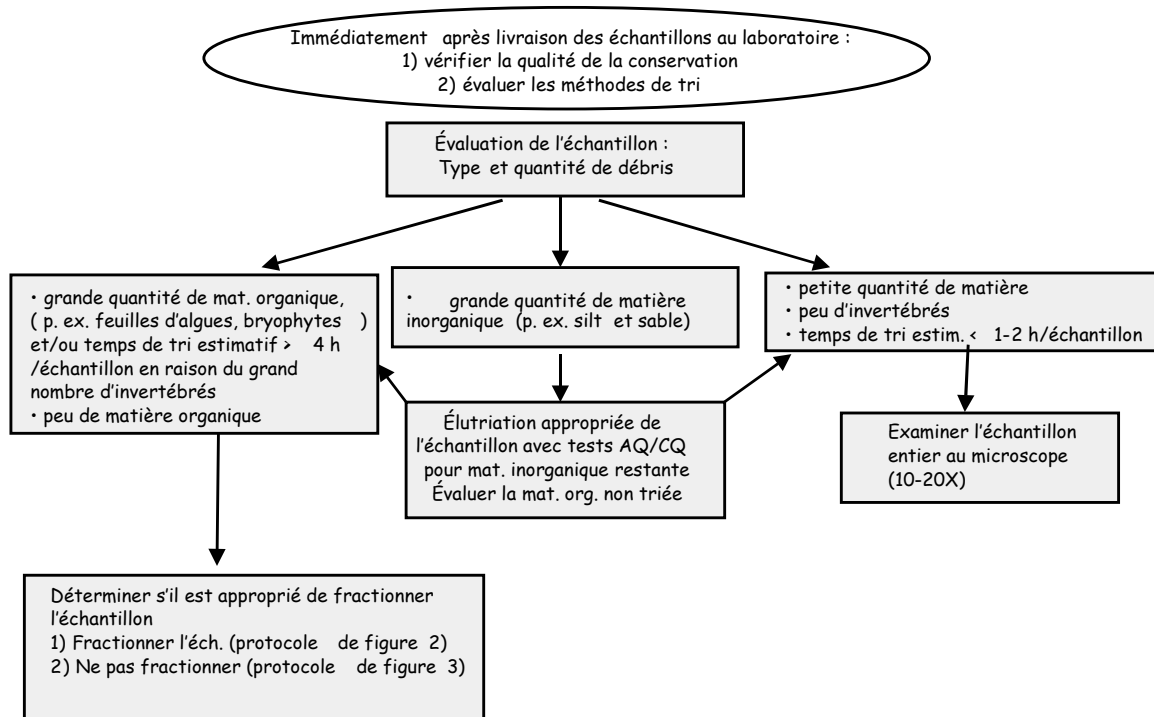
Les étapes de traitement des échantillons recommandées pour le traitement de tout échantillon d'invertébrés benthiques dans le cadre des ESEE sont représentées schématiquement aux figures 1-3. Il s'agit d'exemples qui pourraient s'appliquer à la plupart des échantillons faisant l'objet de points de décision fondés sur le type et la quantité de matière organique et inorganique. S'il y a un nombre suffisant d'organismes dans une fraction donnée, alors une méthode de sous-échantillonnage peut être envisagée (figure 2 et 3, section 3). Chaque laboratoire doit décrire brièvement les méthodes de tri et de sous-échantillonnage spécifiques à l'échantillon et fournir la documentation complète sur les méthodes employées.

Vérification de la qualité de la conservation et évaluation initiale des échantillons

Immédiatement après le retour des échantillons du terrain, il faut procéder à un contrôle de qualité pour s'assurer que l'agent de conservation a effectivement pénétré dans la totalité de l'échantillon (figure 1). Cela est particulièrement important s'il y a présence d'une grande quantité de matières fines dans les échantillons. À ce stade-ci, on peut procéder à une évaluation initiale des échantillons pour faciliter le choix de la méthode la plus efficace et la moins coûteuse pour les traiter. Cette évaluation porterait notamment sur le volume et le type de débris et, si possible, la quantité d'invertébrés présents dans

les échantillons. Cependant, jusqu'au début du tri il est parfois difficile de déterminer le nombre approximatif d'organismes dans un échantillon. Si ce dernier est de taille petite à moyenne, le tri de l'échantillon entier constitue peut-être la méthode de traitement la plus simple, la plus efficace et la moins coûteuse. S'il y a un grand nombre d'organismes, alors le sous-échantillonnage peut se justifier (voir section 3.1 pour les conditions de sous-échantillonnage).

Figure 1 : Résumé des protocoles généraux de traitement des échantillons



Lavage, élutriation et entreposage des échantillons

Si les échantillons renferment de grandes quantités de matière inorganique (silt et sable), qui n'ont pas été éliminées sur le terrain par tourbillonnement dans une cuve puis déversement de la matière organique flottante sur un tamis (Needham et Needham, 1962), cette méthode devrait être appliquée au laboratoire car elle peut réduire jusqu'à 50 % le temps de tri (Rosillon, 1987; Ciboroski, 1991). De plus, cette méthode d'élutriation réduit au minimum les effets négatifs que de grandes quantités de matière inorganique peuvent exercer sur les invertébrés (il est plus difficile de caractériser des spécimens altérés) ou sur le processus de sous-échantillonnage (distribution plus facile sur les tamis ou les plateaux). Avant de jeter une fraction inorganique d'un échantillon, il faut bien examiner visuellement ce dernier pour déceler toute présence d'invertébrés encastrés ou enveloppés dans une coquille (p. ex. phrygranes encastrés dans la roche), qui peuvent être retenus dans la fraction organique.

Au laboratoire, avant le tri des échantillons au microscope, il faut rincer abondamment pour débarrasser la matière organique de l'agent de conservation. Le tri des échantillons directement à partir d'une solution à 10 % de formaline est inutile et non recommandée du point de vue de la santé et de la sécurité. L'échantillon peut être placé dans un tamis (eau douce = 500 µm), l'agent de conservation et les débris fins résiduels étant entraînés par rinçage de l'échantillon. L'élimination des agents de conservation usés doit être effectuée conformément aux réglementations provinciales sur les déchets dangereux (p. ex. Special Waste Regulations en C.-B., Waste Control Regulation en Alberta, Ontario Regulation n° 347, etc.). Lors du rinçage des échantillons, il faut éviter d'appliquer une pression d'eau excessive pour ne pas endommager les organismes. Les échantillons peuvent être triés immédiatement dans l'eau à la condition qu'ils soient remis dans l'agent de conservation à la fin de la journée de travail (c.-à-d. après 8 h). Après le processus de lavage, les échantillons peuvent également être transférés dans de l'éthanol 80 % avant le tri et la résolution taxinomique, à la condition que l'échantillon soit complètement exposé à la formaline 10 % pendant au moins 72 heures. Après le tri ou la caractérisation, la majeure partie des macro-invertébrés d'eau douce doivent être entreposés dans une solution à 70-80 % d'éthanol et 5 % de glycérine à l'intérieur de flacons ou de bocaux fermés par des couvercles hermétiques à l'air. (Les échantillons marins doivent être transférés dans les 3 mois dans de l'éthanol 70-80 %, pour les protéger contre les bris, car les organismes deviennent cassants.) Si on utilise des couvercles vissés, ils doivent être scellés avec une pellicule de cire et il faut les vérifier périodiquement (une ou deux fois par année) pour compenser les pertes par évaporation. Étant donné que les agents de conservation peuvent avoir des effets sur la longueur et le poids des invertébrés (Howmineer, 1972; Leuven *et al.*, 1985), il est indispensable que le protocole exact de préservation pour toutes les étapes soit établi à priori et qu'il soit appliqué entre toutes les phases, zones, stations répétées et habitats.

Fractionnement et tri des échantillons

Les échantillons qui renferment de grandes quantités de morceaux de matière organique doivent être divisés au laboratoire en fractions de taille appropriée de façon à accélérer le processus de tri (figure 2). Les fractions les plus couramment utilisées sont grossières ($> 1,00$ mm) et fines ($500\text{ }\mu\text{m} - 1,00$ mm), ce qui correspond à la classification des catégories employée pour définir la matière organique particulaire grossière et fine. Si un échantillon contient de très gros morceaux de matière organique ou de gros invertébrés, il peut être utile de séparer ces éléments du reste de l'échantillon à l'aide d'un tamis de $4,00$ mm. Toutes les fractions doivent ensuite être triées et, si le nombre élevé d'organismes le justifie, soumises à un sous-échantillonnage distinct (voir section 3.0). À remarquer que dans le cas des échantillons renfermant de grandes quantités d'algues agglutinées, le fractionnement n'est peut-être pas très avantageux. Il convient de prendre des notes détaillées sur toutes ces opérations de tri plus complexes afin de pouvoir calculer les densités de façon précise. Après le rinçage initial et le fractionnement des échantillons, les invertébrés doivent être séparés des débris par des techniciens expérimentés et placés sur un plateau quadrillé ou dans une boîte de Pétri pour examen au microscope à dissection sous un grossissement de $10\times 20\times$.

Diverses autres méthodes permettent d'accélérer le tri manuel des échantillons d'invertébrés benthiques. On peut par exemple recourir à la flottation dans des solutions à haute densité (p. ex., sulfate de magnésium, chlorure de sodium, chlorure de calcium, sucre, D-mannitol) ou au barbotage pour séparer les organismes des particules de sédiments plus denses et les piéger dans la pellicule superficielle. Les organismes plus lourds comme les mollusques ne flottent pas et peuvent être retirés directement à l'aide de pincettes. On peut également utiliser des colorants comme le rose Bengale ou la phloxine B à raison de 100 mg/L pour rendre les organismes plus visibles. Il convient toutefois de rappeler que l'efficacité d'un grand nombre de ces techniques varie d'un taxon à l'autre (Rosillon, 1987). Si l'on décide d'utiliser une de ces méthodes, les tests d'AQ/CQ effectués sur ces échantillons doivent être conçus de manière à détecter toute différence éventuelle dans l'efficacité du tri selon les taxons, imputable à la méthode de coloration utilisée.

Figure 2 : Traitement de l'échantillon avec fractionnement sur tamis

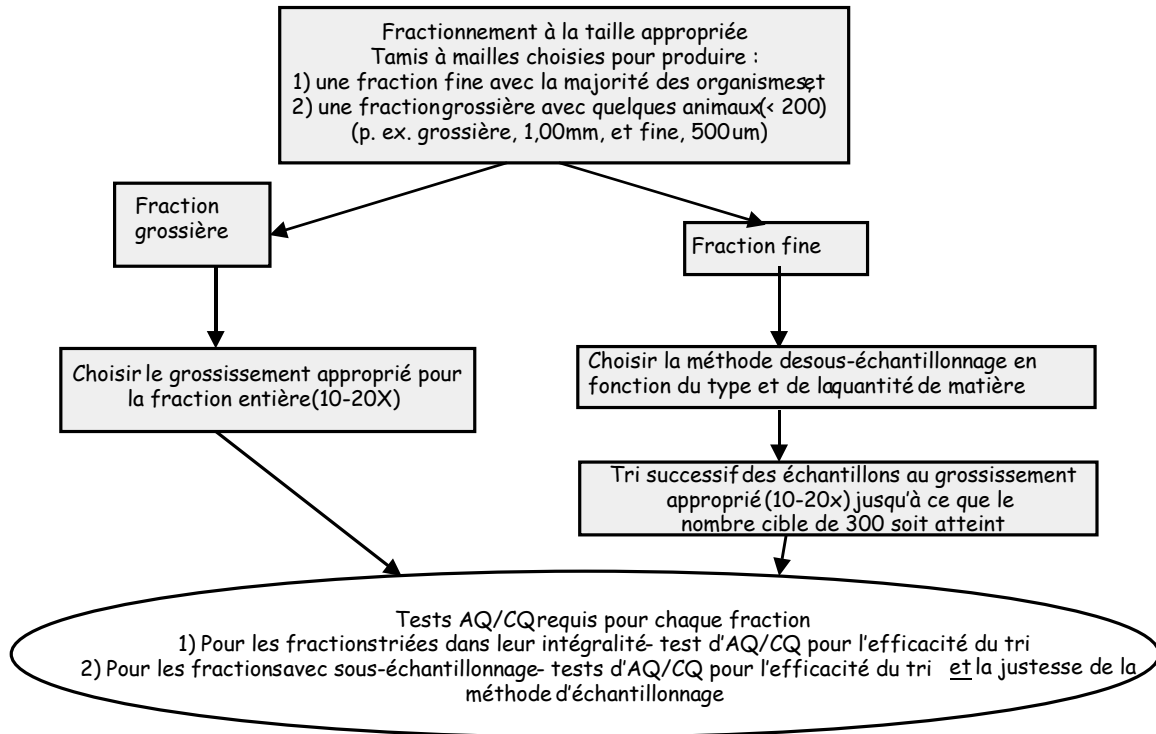
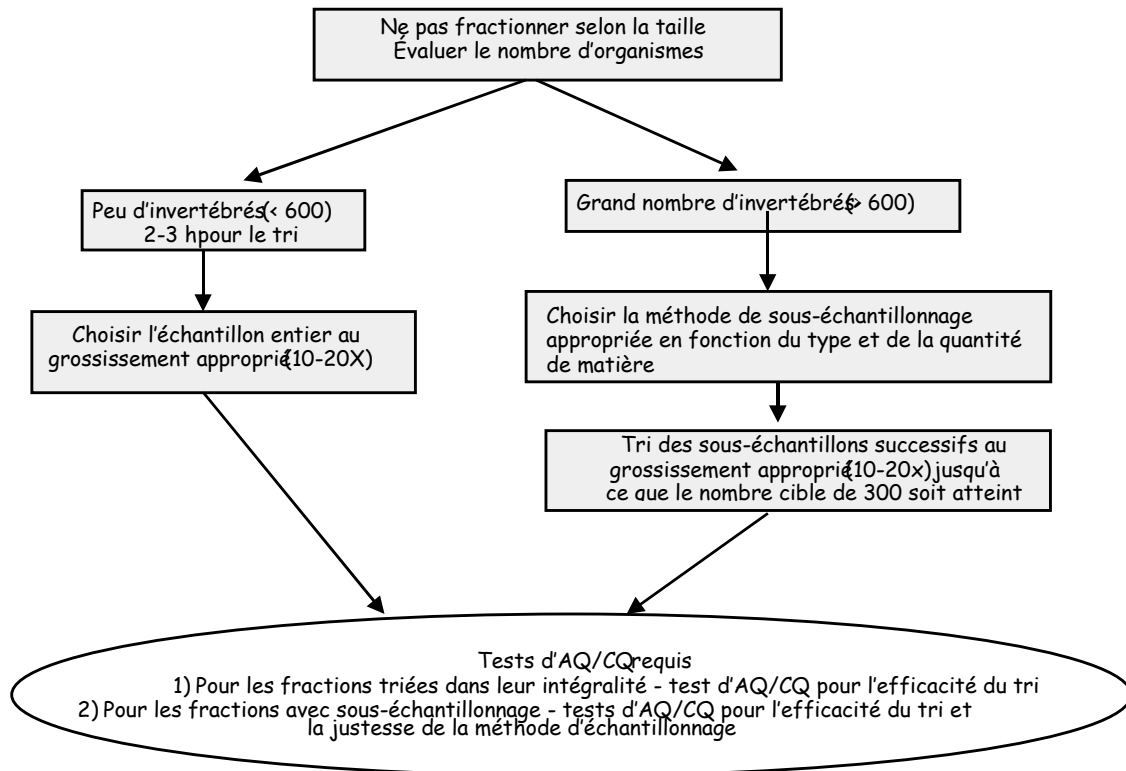


Figure 3 : Traitement des échantillons sans fractionnement sur tamis



AQ/CQ pour le tri des échantillons

Lors du traitement de base des échantillons d'invertébrés benthiques, il faut séparer les organismes des grandes quantités de débris présents, opération qui est très longue. Lors de cette phase de tri, il se produit inévitablement des erreurs, quels que soient les soins apportés au traitement, erreurs qui doivent être évaluées (p. ex. Kreis, 1986, 1989). La première composante de l'AQ/CQ pour le traitement des échantillons d'invertébrés benthiques exige l'évaluation de l'efficacité de ce tri (c.-à-d. la proportion du nombre total d'organismes extraite de l'échantillon grâce au tri). Une efficacité de tri élevée permettra de calculer les mesures terminales de façon raisonnablement fiable et sans biais entre les échantillons. Pour l'évaluation de l'efficacité du tri dans le programme de ESEE PP et MM, on recommande de soumettre au moins 10 % de tous les échantillons de chaque étude à un nouveau tri et de dénombrer tous les organismes présents lors de ce dernier tri. Un tri est jugé acceptable si > 90 % du nombre total d'organismes sont récupérés lors du tri initial. Si on trouve > 10 % du nombre total lors du nouveau tri, alors tous les échantillons faisant partie de ce groupe particulier d'échantillons doivent faire l'objet d'un nouveau tri. Parmi les facteurs qui doivent être considérés lors de la caractérisation de groupes similaires d'échantillons, il y a les suivants : 1) zone d'échantillonnage, 2) classe d'habitat; 3) personne chargée du tri. Les consignes d'AQ/CQ s'appliquent indépendamment à chaque fraction d'échantillon et à chaque groupe d'échantillons triés. Un autre critère qui imposerait un nouveau tri serait le fait qu'un groupe entier d'invertébrés benthiques n'a pas été extrait des débris (p. ex. les ostracodes n'ont pas été caractérisés et triés), et ce même si les organismes manqués constituaient < 10 % du nombre total d'organismes. Les fractions triées et non triées doivent être conservées tant et aussi longtemps que l'efficacité du tri et l'exactitude des identifications n'auront pas été confirmées et les données examinées par les coordonateurs régionaux des ESEE. L'efficacité du tri obtenue pour chaque série d'échantillons doit être calculée comme dans l'encadré ci-dessous et indiqué pour toutes les études. À noter que, si l'efficacité du tri est acceptable (> 90 %), les organismes du nouveau tri sont écartés de toute analyse ultérieure, du fait qu'ils ne font pas partie du processus complet de tri.

Calcul de l'efficacité du tri

Efficacité du tri (en %) = $[1 - (\text{nombre dans nouveau tri AQ/CQ} / (\text{nombre dans tri initial} + \text{nombre dans nouveau tri AQ/CQ}))] \times 100$

Exemple :

- 37 invertébrés décelés dans le nouveau tri AQ/CQ
- 393 invertébrés récupérés lors du tri initial
- l'efficacité du tri calculée est de 91,4 % :

efficacité du tri (en %) = $[1 - (37 / (393 + 37))] \times 100$

Si l'efficacité est inférieure à 90 % pour l'un quelconque des groupes d'échantillons, tous les échantillons de ce groupe doivent faire l'objet d'un nouveau tri.

3.0 Méthodes de sous-échantillonnage en laboratoire

3.1 Quand sous-échantillonner

Le traitement d'échantillons quantitatifs d'invertébrés benthiques est très laborieux, principalement en raison du temps requis pour extraire un grand nombre d'invertébrés à partir d'importantes quantités de matière inorganique (sable et gravier) et organique (algues, feuilles, bryophytes) [Rosillon, 1987; Ciborowski, 1991]. Les deux principaux facteurs qui influent sur le temps nécessaire au tri d'un échantillon donné sont le nombre d'organismes et la quantité de débris présents dans l'échantillon. De fait, ces deux facteurs expliquent près de 95 % (respectivement 84 et 10 %) de la variation du temps de tri pour une série d'échantillons examinés par Ciborowski (1991). Le temps de tri peut augmenter du tiers pour les échantillons renfermant des algues *Cladophora* agglutinées. Au fil des ans, un certain nombre de stratégies ont été élaborées pour réduire ce temps de tri (Resh *et al.*, 1985); mais, ces méthodes d'économie de temps ne doivent pas nuire à la qualité des données. Parmi les moyens d'économiser le temps de traitement, il y a l'élutriation, le fractionnement, la flottation et l'emploi de colorants, qui sont examinés dans la section précédente (2.0). Ces moyens permettent d'accélérer les longues procédures de traitement, résultant de la présence de grandes quantités de matière organique ou inorganique. Pour diminuer le temps de traitement, inhérent à la présence d'un grand nombre d'invertébrés dans un échantillon donné, on a mis au point diverses techniques de sous-échantillonnage. Ces techniques réduisent sensiblement le temps de traitement et les dépenses connexes, tout en permettant d'estimer adéquatement la densité et la composition taxinomique de l'échantillon entier (Vinson et Hawkins, 1996). L'objectif de tout programme de sous-échantillonnage doit être de réduire au minimum les efforts consentis (et donc les coûts) tout en recueillant le maximum d'information et en obtenant des résultats statistiquement fiables (Wrona *et al.*, 1982). Ainsi, la décision d'utiliser des techniques comme le fractionnement est fondée sur la quantité et le type de débris présents dans l'échantillon, alors que celle de sous-échantillonner repose sur le nombre d'organismes présents dans l'échantillon. Ces trois points de décision sont représentés schématiquement aux figures 2 et 3.

3.2 Recommandations pour le sous-échantillonnage dans les programmes d'ESEE

Les protocoles de sous-échantillonnage présentés dans les sections suivantes sont recommandés comme démarche générale pour le traitement d'échantillons benthiques types provenant de cours d'eau ou de lacs (figures 2 et 3). Cependant, le bien-fondé de ces approches générales devra être évalué par une étude individuelle basée sur le type de matière et le nombre d'organismes. La présentation détaillée de la précision et de la justesse du sous-échantillonnage pour toutes les méthodes employées est essentielle dans tout processus d'AQ/CQ des programmes d'ESEE pour les invertébrés benthiques.

Fractionnement sur tamis et sous-échantillonnage

Dans le cas de tous les échantillons pour lesquels on envisage un sous-échantillonnage, et particulièrement pour ceux qui comportent de grandes quantités de morceaux de matière organique, il est fortement recommandé de diviser les échantillons au laboratoire en fractions de taille appropriée pour permettre d'effectuer rapidement le tri (voir section 2.0). Le tamisage donne une fraction plus homogène, ce qui permet de prélever efficacement les sous-échantillons choisis au hasard (Anderson, 1990) dans la fraction appropriée (Taylor et Bailey, 1997). Il faut choisir un tamis à maille appropriée pour séparer les matières organiques fine et grossière, mais en même temps pour prélever la majeure partie des organismes en une seule fraction, ce qui permet d'améliorer la fiabilité du sous-échantillonnage (Rossillon, 1987; Meyer, 1990). Ainsi, le choix d'une maille pour particules grossières peut être associée à la taille des animaux présents dans l'échantillon. Généralement, une paire de tamis de 1,00 mm et 500 μm (500 μm = maille fine et dimension de la maille du tamis recommandées pour le ESEE) est suffisante, mais des tamis à maille plus grande, comme 2,00 ou 4,00 mm, peuvent également convenir s'il y a présence de beaucoup de grands invertébrés dans les échantillons. La technique de sous-échantillonnage appropriée est ensuite appliquée à la fraction fine, vu que la majeure partie des invertébrés seront recueillis sur le tamis à maille fine. Cependant, dans le cas des échantillons pour lesquels le fractionnement n'est pas applicable (p. ex. échantillons avec algues agglutinées), il existe des méthodes de sous-échantillonnage appropriées (p. ex. poids humide), qui ne requièrent pas de fractionnement (section 2.3).

Nombre minimal d'organismes

Une réduction potentielle de la justesse des estimations des mesures terminales est inhérente au sous-échantillonnage. Le risque d'erreur est plus grand pour les petits sous-échantillons ou pour les taxons moins communs (Wrona *et al.*, 1982; Meyer, 1990). De nombreuses études reprennent la proposition de Lund *et al.* (1958), à savoir que, d'après la distribution de Poisson, une justesse raisonnable peut être obtenue lorsque > 100 organismes sont dénombrés (Hickley, 1975; Elliott, 1977; Wrona *et al.*, 1982; Rosillon, 1987; Klemm *et al.*, 1990). Des instructions antérieures précisait qu'il faut continuer le sous-échantillonnage jusqu'à ce qu'un niveau de variance préétabli soit obtenu suite à la démarche décrite brièvement par Wrona *et al.* (1982). Pour chaque étude/sous-échantillonnage, une évaluation comprendrait une description de la tendance dans la variance au fur et à mesure que le nombre d'animaux triés augmente. Wrona *et al.* (1982) ont trouvé que, pour le sous-échantillonneur à cône d'Imhoff, à mesure que le nombre total d'animaux dénombrés dépasse 50 et approche de 100, l'atténuation de l'erreur de sous-échantillonnage en fonction de l'effort consenti diminue. Cependant, dans le cas de dénombrements de taxons moins communs, cette variance peut être plus grande pour un nombre trié donné (Wrona *et al.*, 1982). Les programmes de ESEE n'ont pas établi explicitement un nombre minimal normalisé d'organismes à trier. Ainsi, les nombres minimaux pourraient varier largement en fonction de la technique utilisée ou de la variance dans l'échantillon. Avec, comme objectif national, la comparaison des études de ESEE dans l'ensemble du pays, et la recommandation de mesures terminales pour les effets, y compris le nombre de taxons, une normalisation plus poussée des protocoles de

sous-échantillonnage sera bénéfique, et notamment la spécification du nombre minimal d'organismes.

De nombreuses études ont tenté d'élaborer des recommandations pour le nombre minimal d'organismes qui donne une justesse et (ou) une précision raisonnable(s) pour le sous-échantillonnage. Une grande partie de la documentation traite des méthodes à dénombrement préétabli, vu que le nombre d'organismes représente manifestement un paramètre critique dans ce processus. Le nombre minimal initialement recommandé dans la documentation a été fixé à 100 (Plafkin *et al.*, 1989), alors que des recommandations plus récentes le situent dans une plage de 100-300 (Caton, 1991; Hannaford et Resh, 1995; Vinson et Hawkins, 1996; Grownes *et al.*, 1997; Larsen et Herlihy, 1998; Somers *et al.*, 1998). Dans ces évaluations plus récentes, la mesure terminale le plus en vue est généralement le nombre de taxons, vu que cette donnée métrique est liée à l'effort consenti pour l'échantillonnage (ou le sous-échantillonnage) et que c'est le nombre le plus élevé (300) qui est généralement recommandé (Barbour Gerritsen, 1996; Vinson et Hawkins, 1996; Larsen et Herlihy, 1998; Somers *et al.*, 1998). Étant donné que le nombre de taxons est l'une des mesures terminales pour les invertébrés benthiques du ESEE, on recommande d'adopter une méthode prudente pour déterminer le nombre minimal d'organismes. Par conséquent, bien que l'aspect le plus important d'un programme de sous-échantillonnage soit la justesse des estimations des mesures terminales, la recommandation voulant qu'un nombre minimal de 300 organismes soit prélevé d'un échantillon dans tout programme de sous-échantillonnage assure une normalisation additionnelle pour toutes les méthodes et études dans le cadre du programme de ESEE. À noter que si le nombre minimal est atteint au cours du tri d'un sous-échantillon, ce dernier doit faire l'objet d'un tri dans son intégralité, de telle façon que la fraction triée soit quantitative. On pourrait également adopter une proportion minimale d'échantillon à trier (p. ex. 25 %); mais, pour les très grands échantillons, cela pourrait encore représenter une charge de travail significative (Ciborowski, 1991), et on ne le recommande donc pas, étant donné que c'est la justesse de l'estimation au point de référence qui représente la mesure ultime dans toute méthode de sous-échantillonnage.

Erreur acceptable pour les protocoles de sous-échantillonnage

Quelle que soit la technique de sous-échantillonnage utilisée, il est essentiel d'étayer la justesse de l'estimation pour s'assurer que les données sont comparables à l'intérieur des études et entre celles-ci. De fait, le principal critère pour évaluer une technique de sous-échantillonnage est l'évaluation de sa capacité d'estimer avec précision les nombres et les types d'organismes dans un échantillon. L'examen des rapports d'interprétation du cycle 2 a montré que la justesse du sous-échantillonnage n'était généralement pas donnée. Parmi les rapports qui présentaient un quelconque type d'erreur, la majorité donnaient la précision obtenue par comparaison de deux sous-échantillons. Par exemple :

- 1) dénombrement dans le sous-échantillon A = 289
- 2) dénombrement dans le sous-échantillon B = 316
- 3) la précision indiquée pour ces deux sous-échantillons serait de 8,5 %, soit $(1 - [289/316]) \times 100$.

Si tous les sous-échantillons provenant de cet échantillon particulier donnaient une précision similaire, alors la justesse serait elle aussi proche de 9 %. Cependant, sans procéder au tri du reste de l'échantillon, il n'est pas possible de déterminer la justesse. Les études, qui indiquaient la justesse pour les sous-échantillons, suivaient les recommandations des documents d'orientation. Il y a eu tri de plusieurs sous-échantillons pour 10 % de tous les échantillons, **le reste des échantillons faisant ensuite l'objet d'un tri dans sa totalité**. La justesse du sous-échantillonnage peut ensuite être calculée par comparaison des estimations provenant des sous-échantillons au dénombrement réel. Par exemple :

- 1) dénombrement dans le sous-échantillon A = 289, représentant 15 % de l'échantillon en volume, ce qui correspond à une estimation de 1927 pour le total dans l'échantillon
- 2) dénombrement dans le sous-échantillon B = 316, représentant 15 % de l'échantillon en volume, ce qui correspond à une estimation de 2106 pour le total dans l'échantillon
- 3) dénombrement dans le reste de l'échantillon = 1359, correspondant à un total réel de 1964
- 4) la précision indiquée serait la même que dans le premier exemple, soit 8,5 %
- 5) la justesse indiquée serait de -1,9 % et +7,2 % respectivement pour l'échantillon A et B.

La précision et la justesse des méthodes de sous-échantillonnage représentent toutes deux de l'information qui est essentielle si on veut être sûr que le programme de sous-échantillonnage estime avec justesse les nombres d'organismes dans l'échantillon. L'objectif premier du sous-échantillonnage est de réduire la charge de travail considérable que demande le traitement des échantillons benthiques, mais sans nuire à la qualité des données. Comme critère d'erreur acceptable pour le sous-échantillonnage, la majorité des études du cycle 2 ont utilisé la règle de précision de 20 %, proposée par Elliott (1977). Autrement dit, si la précision entre deux sous-échantillons était $< 20\%$, l'erreur était jugée acceptable (voir l'exemple pour la précision ci-dessus). Cela a été appliqué à la précision des estimations, mais peut également l'être à la justesse de celles-ci. Bien que la justesse et la précision qu'on peut obtenir dépendent de beaucoup de facteurs, y compris de la variabilité inhérente des échantillons sur le terrain (Norris *et al.*, 1996), la normalisation des techniques d'ESEE devrait réduire au minimum cette variabilité. Beaucoup de chercheurs ont indiqué que cela est souhaitable pour obtenir des estimations se situant à moins de $> 20\%$ du dénombrement réel (Hickley, 1975; Elliott, 1977; Downing, 1979; Wrona *et al.*, 1982; Resh et McElvry, 1993) et, de fait, un grand nombre des techniques de sous-échantillonnage examinées et recommandées ont montré qu'au moins ce niveau de justesse peut être atteint (Hickley, 1975; Wrona *et al.*, 1982; Rosillon, 1987; Meyer, 1990). Le critère pour un protocole de sous-échantillonnage acceptable est donc que les estimations de chaque groupe d'échantillons se situe à moins de 20 % des dénombrements réels. Parmi les facteurs dont il faut tenir compte pour la détermination de groupes d'échantillons similaires, il y a les suivants : 1) technique de sous-échantillonnage; 2) type d'échantillon (c.-à-d. type et quantité de matière organique). Comme pour l'efficacité du tri, il faut, dans l'ESEE, examiner les effets du

sous-échantillonnage sur la justesse des estimations de l'abondance pour au moins 10 % des échantillons (ou groupes d'échantillons), et l'indiquer de façon appropriée (tableau 1). S'il n'est pas possible de montrer que le niveau d'erreur est acceptable pour une technique particulière ou une série donnée d'échantillons (p. ex. renfermant des débris agglutinés ou ne se prêtant pas à un mélange aléatoire), alors la technique doit être modifiée de façon à atteindre ce niveau de précision ou de justesse, ou encore l'échantillon doit être soumis à un tri dans son intégralité.

Une remarque s'impose ici pour ce qui peut être considéré comme raisonnable dans la recherche de la justesse. Le point important est de fournir de la documentation concernant la justesse des estimations, ce qui faisait défaut dans beaucoup de rapports du cycle 2. Il est recommandé ici qu'on ajoute essentiellement une estimation de justesse du sous-échantillonnage à une ESEE normalisée (en supposant un type d'échantillon similaire, 10 % de 5 expositions + 5 échantillons de référence = 1). On ne veut pas que la documentation sur la justesse du sous-échantillonnage devienne plus coûteuse que le tri de tous les échantillons. De plus, si la technique est bien établie avec divers types d'échantillons, ayant fait l'objet d'une publication dans la documentation spécialisée, alors cet exercice confirme simplement que la technique est *appliquée* de façon appropriée. En fait, un entrepreneur donné pourrait être en mesure de démontrer qu'une technique est applicable pour un ensemble d'échantillons aux caractéristiques similaires couvrant plus d'une ESEE (p. ex. des échantillons traités au cours d'une saison par le[s] même[s] opérateur[s]).

Tableau 1 Exemple de présentation recommandée pour l'erreur de sous-échantillonnage.
L'exemple porte sur une méthode basée sur le volume et utilisant le cône d'Imhoff (Wrona *et al.*, 1982), où jusqu'à 10 sous-échantillons sont triés et où le reste de l'échantillon a été trié.
On présente la justesse pour chaque sous-échantillon, la justesse minimale, maximale et moyenne du sous-échantillonnage ainsi que la plage de précision entre les sous-échantillons.

Sous-échantillon n°	Nbre d'invertébrés	Nombre prévu	Nbre prévu-total dans éch.	Diff. avec réel (%)
1	218	3815	101	2,7
2	220	3850	136	3,7
3	230	4025	311	8,4
4	221	3868	154	4,1
5	221	3868	154	4,1
6	201	3518	-197	-5,3
7	219	3833	119	3,2
8	205	3588	-127	-3,4
9	221	3868	154	4,1
10	210	3675	-39	-1,1
Total dans reste	1548			
Total dans éch	3714			
Erreur absolue moyenne du sous-échant.				4,0
Plage de précision 0,5 - 9 %				Erreur min. (%) 1,1
				Erreur max. (%) 8,4

3.3 Méthodes de base pour le sous-échantillonnage en laboratoire

Une fois qu'il a été établi que le sous-échantillonnage permettra de réaliser des économies significatives en temps pour le traitement des échantillons qui renferment un grand nombre d'invertébrés (généralement plus de 500-600), on peut choisir une méthode appropriée. Diverses méthodes de sous-échantillonnage en laboratoire sont disponibles; elles sont décrites brièvement par Wrona *et al.* (1982); Sebastien *et al.* (1988); Marchant (1989); Plafkin *et al.* (1989); Klemm *et al.* (1990); Canton (1991) et Mason (1991). Quelle que soit la méthode choisie, il faut suivre les protocoles généraux recommandés ainsi que le processus d'AQ/CQ figurant dans la documentation (sections 2.1 et 2.2), car ces aspects ont une importance critique pour les comparaisons des ESEE à l'échelle nationale.

Il y a deux démarches de base pour le sous-échantillonnage des échantillons d'invertébrés benthiques. Les méthodes à dénombrement préétabli et les méthodes à fractionnement préétabli (Barbour et Gerritsen, 1996). La méthode à dénombrement préétabli est habituellement utilisée pour le dénombrement des échantillons de plancton (Charles *et al.*, 1991); elle a été adaptée pour le tri des échantillons benthiques par Hilsenoff (1987, 1988), puis raffinée et modifiée par Plafkin *et al.* (1989) pour utilisation avec les RBP (Rapid Bioassessment Protocols) de l'EPA (États-Unis). Tout au long de l'élaboration de la méthode, le nombre total d'organismes à dénombrer (p. ex. 100, 200, 300) a fait l'objet de nombreuses discussions (Plafkin *et al.*, 1989; Caton, 1991; Hannaford et Resh, 1995; Growns *et al.*, 1997; Doberstein *et al.*, 2000; Carter et Resh, 2001), mais le principe de base est le tri et le dénombrement d'une quantité préétablie d'organismes dans un échantillon donné quel qu'il soit. Le but initial de l'utilisation des méthodes de dénombrement préétabli avec les RBP était de faciliter le retour rapide des données pour l'analyse et l'interprétation, permettant ainsi l'identification de sites où d'autres études potentielles seraient utiles (Plafkin *et al.*, 1989; Hannaford et Resh, 1995). Pour ces objectifs, les méthodes de dénombrement préétabli sont comparables d'un site à l'autre, du fait de l'uniformité de l'effort unitaire consenti. Cependant, comme le souligne Cortemanch (1996), un effort consenti préétabli ne doit pas être confondu avec taille d'échantillon. On ne sait pas si les 100 organismes dénombrés provenaient d'un échantillon de 500 ou de 5000 animaux. Les méthodes à dénombrement préétabli conviendraient mieux pour les systèmes métriques proportionnels (p. ex. % d'EPT, Cortemanch, 1996). Mais, comme aucune des mesures terminales pour les effets benthiques n'est un système proportionnel, ils ne pourraient être estimés de façon fiable à l'aide des méthodes de sous-échantillonnage à dénombrement préétabli. Par conséquent, bien que de nombreux documents examinent les mérites et l'applicabilité des méthodes à dénombrement préétabli, particulièrement pour les objectifs de bioévaluation rapide, ces méthodes ne répondraient pas aux objectifs du programme d'ESEE où des méthodes quantitatives sont requises.

Il existe plusieurs méthodes de sous-échantillonnage à fractionnement préétabli, dont l'objectif est simplement de diviser un grand échantillon en plusieurs portions, qui sont

chacune une représentation aléatoire de l'échantillon entier. Ces portions plus petites peuvent être traitées plus efficacement et à un coût moins élevé tout en donnant des estimations fiables du nombre total et des types d'organismes présents dans l'échantillon. Les trois méthodes les plus couramment employées divisent l'échantillon en fonction 1) de la surface, 2) du poids, ou 3) du volume de l'échantillon. La méthode qui convient le mieux dépend du type et de la quantité de matière présente dans l'échantillon. Ces méthodes sont brièvement décrites ci-dessous.

Fractionnement des échantillons sur tamis selon la surface

Il existe plusieurs variantes pour les méthodes de sous-échantillonnage selon la surface, allant de simples plateaux ou cadres grillagés à des dispositifs élaborés de fractionnement sur tamis (Sodergren, 1974; Hickley, 1975; Klattenburg, 1975; Rosillon, 1987; Marchant, 1989; Klemm, 1990; Meyer, 1990; Caton, 1991; Mason, 1991); la méthode la plus couramment employée dans les programmes de ESEE s'inspire de la technique de fractionnement selon le diamètre du tamis de Cuffney *et al.* (1993). La méthode consiste à répartir uniformément la matière sur un plateau ou un tamis et à séparer de façon aléatoire une fraction ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{8}$) par surface plane. Plus précisément, l'échantillon est placé sur un tamis marqué par six diamètres équidistants. Le tamis est immergé dans l'eau et agité de façon à distribuer uniformément la matière; on draine ensuite l'eau. On tire au sort avec un dé l'un des six diamètres marqués, qui sera utilisé pour fractionner l'échantillon; une règle sert ensuite à diviser le tamis en moitiés en l'alignant avec les marques et en pressant le bord de la règle dans l'échantillon. Un grattoir et un flacon laveur servent à séparer l'échantillon en moitiés et à prélever les portions choisies. Une fois l'échantillon fractionné, on choisit au hasard par pile ou face la moitié de l'échantillon qui sera fractionnée. NE PAS jeter l'autre moitié de l'échantillon, car elle pourrait être nécessaire pour les tests d'AQ/CQ ou, si la moitié de l'échantillon ne renferme pas assez d'animaux pour satisfaire au critère de 300 animaux, elle devra être triée. Toutes les fractions triées et non triées doivent être conservées jusqu'à ce que l'efficacité du tri et de la résolution taxinomique soient confirmées et que les données soient examinées par l'agent d'assurance de la qualité. Il se peut qu'il soit nécessaire de fractionner plusieurs fois les très grands échantillons pour obtenir des fractions se prêtant au sous-échantillonnage, mais il faudra identifier pour chaque fraction la moitié correspondante et la conserver pour les tests d'AQ/CQ jusqu'à ce que les données soient vérifiées et acceptées. On procède au tri de la (des) fraction(s) appropriée(s) et on calcule le nombre total d'organismes dans l'échantillon original en prenant l'inverse de la fraction (section 3.4).

Une nouvelle variante de cette méthode de sous-échantillonnage selon la surface, utilisant un appareil modifié, a été mise au point récemment par des chercheurs de l'INRE (Environnement Canada, 2002). Ressemblant plus ou moins à l'appareil et au procédé décrits par Meyer (1990) et Mason (1991), il permet de manipuler les grands échantillons, comme ceux généralement prélevés dans le cadre des programmes d'ESEE, et les divise en 4 quarts. L'appareil est constitué d'une tige agitatrice et d'un tube (8" de diam.) en PVC de 60 cm de long, dans lequel est fixé un tamis (amovible), préalablement divisé en quarts à l'aide d'un cadre encastré. Le tube renfermant le tamis est immergé

jusqu'à une profondeur de 40-50 cm dans un seau standard de 20 L rempli d'eau. On verse l'échantillon dans le tube et on agite pendant au moins 30 secondes avec la tige. On retire la tige en s'assurant qu'aucun organisme n'y adhère, et on retire rapidement tout le dispositif hors de l'eau. Pendant que l'eau s'écoule du tamis, les débris et les invertébrés se déposent uniformément sur le tamis. On détache ensuite le tamis du tube et on fait passer toute matière, comme les algues filamenteuses, qui chevauchent deux quarts, dans le quart où se trouve la majeure partie de cette matière. On place un gabarit en PVC au-dessus du tamis et on prélève facilement un quart de l'échantillon à l'aide soit d'une spatule soit d'un flacon laveur. D'autres quarts peuvent être prélevés de la même façon du tamis et conservés de façon appropriée aux fins de tri ou d'archivage. Les tests pour le fractionnement aléatoire des échantillons ont donné des résultats satisfaisants.

Fractionnement des échantillons selon le volume

La méthode du cône d'Imhoff, décrite de façon détaillée par Wrona *et al.* (1982), distribue aléatoirement la matière organique fine et les invertébrés dans un volume de 1 litre. Le protocole recommandé comprend le fractionnement initial de l'échantillon en fractions grossière et fine; on obtient ainsi une fraction fine homogène renfermant un grand nombre d'organismes. Cette fraction est ensuite placée dans le dispositif à cône et on complète avec de l'eau jusqu'à la ligne de 1 litre. Pour une répartition aléatoire de la matière, on injecte de l'air diffusé par un bloc siliconé à la base du cône de façon à agiter légèrement l'échantillon pendant 2-5 min. À noter que la matière organique aurait dû être retirée précédemment, lors de l'étape d'élutriation, sinon elle s'agglutine au fond du cône, ce qui réduit l'efficacité du bloc diffuseur d'air. Environ 50 % de l'échantillon peut être retiré du cône à l'aide de tubes à essai de 55 mL pendant que l'agitation de l'échantillon est maintenue. Les sous-échantillons des tubes à essai sont triés séquentiellement jusqu'à ce qu'on atteigne le minimum de 300 animaux. Si, comme dans les autres méthodes de sous-échantillonnage, ce nombre minimal est atteint au cours du tri d'un sous-échantillon, ce dernier doit être trié en entier de telle façon qu'une fraction connue soit triée. La portion de l'échantillon demeurant dans le cône est conservée avec le contenu de tous les tubes à essai, triés ou non, pour utilisation potentielle ultérieure à des fins de tri destiné au calcul de la justesse du sous-échantillonnage. Cette méthode de sous-échantillonnage est simple et efficace pour une vaste gamme de types d'échantillons benthiques. Cependant, il est possible que la technique ne soit pas compatible avec les échantillons renfermant de grandes quantités d'algues filamenteuses.

Fractionnement de l'échantillon selon le poids

Cette méthode, comme la décrivent Sebastien *et al.* (1988), est une technique de rechange simple et fiable pour le sous-échantillonnage d'échantillons d'invertébrés benthiques, et particulièrement de ceux où des macro-invertébrés sont enchevêtrés avec des algues filamenteuses ou des bryophytes. La technique consiste à mélanger énergiquement l'échantillon dans un bécher de 2 litres de façon à obtenir une distribution aléatoire, puis de verser et de répartir uniformément la matière sur un tamis préalablement pesé. L'échantillon humide (avec le tamis) est pesé à 0,1 g près pour obtenir le poids total de l'échantillon. La matière est prélevée de façon aléatoire du tamis, en fractions appropriées

(p. ex. environ 10 % ou 25 % de la matière); on consigne le poids du sous-échantillon afin de déterminer la fraction réelle de ce dernier. Une fois l'échantillon fractionné, on choisit au hasard la première fraction à trier. Les sous-échantillons consécutifs sont triés jusqu'à récupération d'un nombre minimum de 300 animaux, et la dernière fraction est triée en entier. Les autres fractions sont conservées pour d'éventuels tests d'AQ/CQ.

3.4 Calcul des facteurs de correction, de la précision et de la justesse pour le sous-échantillonnage

Facteurs de correction pour les sous-échantillons et calcul des estimations de densités pour l'échantillon entier

Le facteur de correction et l'équation pour convertir les valeurs obtenus pour les sous-échantillons en estimations pour l'échantillon entier s'établissent comme suit :

- 1) Facteur de correction (FC) = surface, volume ou poids de l'échantillon entier/surface, volume ou poids du (des) sous-échantillon(s) trié(s) pour obtenir le dénombrement minimal de 300 organismes
- 2) Estimation de la densité de l'échantillon entier = nombre d'organismes dans le(s) sous-échantillon(s) x FC

Exemples:

Méthodes basées sur la surface

Facteur de correction = surface totale du tamis (415 cm²)/ nombre de sous-échantillons triés x surface de chaque sous-échantillon (41,5 cm²).

- 2 sous-échantillons triés pour atteindre le dénombrement de 300.
- le dénombrement final après tri du deuxième sous-échantillon dans son intégralité est de 347.
- Facteur de correction = $415 / (2 \times 41,5) = 5$

Estimation du nombre total d'organismes dans l'échantillon = $347 \times 5 = 1735$

Méthodes basées sur le volume

Facteur de correction = volume total d'échantillon dans le cône d'Imhoff (1000 mL)/ nombre de tubes triés x volume d'un tube (55 mL)

- 4 tubes triés pour atteindre un dénombrement de 300.
- dénombrement final après tri du quatrième tube dans son intégralité = 365.

- Facteur de correction = $1000 \text{ mL} / (4 \times 55 \text{ mL}) = 4,55$.

Estimation du nombre total d'organismes dans l'échantillon = $365 \times 4,55 = 1661$

Méthodes basées sur le poids

Facteur de correction = poids total de l'échantillon, soit 30,5 g (poids de l'éch. + tamis – poids du tamis)/poids total de tous les sous-échantillons triés (11,7 g)

- 3 sous-échantillons ont été triés pour atteindre un dénombrement de 300
- le dénombrement final après tri de la troisième fraction pondérale = 419
- facteur de correction = $30,5 \text{ g} / 11,7 \text{ g} = 2,6$

Estimation du nombre total d'organismes dans l'échantillon = $419 \times 2,6 = 1089$

Détermination de la justesse et de la précision du sous-échantillonnage

Les effets du sous-échantillonnage sur les estimations de l'abondance doivent être examinés pour au moins 10 % des échantillons. Si l'erreur dépasse 20 % pour l'un quelconque des groupes d'échantillons, tous les échantillons de ce groupe doivent être complètement triés pour s'assurer que le processus de sous-échantillonnage ne nuit pas à l'intégrité des données. Pour cela, il faut que 10 % des échantillons qui ont été sous-échantillonnés soit choisis au hasard et que la matière restante (non triée) soit triée dans son intégralité. On compare ensuite les estimations (calculées comme ci-dessus) aux dénombrements réels provenant de l'échantillon, la justesse des estimations et la précision entre les sous-échantillons pouvant être calculées comme suit :

Justesse de l'estimation du sous-échantillonnage

$\% \text{ d'erreur dans l'estimation} = [1 - (\text{nombre estimatif dans éch.} / \text{nombre réel dans éch.})] \times 100$

Exemple (repris de la section 3.2)

- 1) dénombrement dans le sous-échantillon A = 289, représentant 15 % de l'échantillon en volume, ce qui correspond à une estimation de 1927 pour le total dans l'échantillon
- 2) dénombrement dans le sous-échantillon B = 316, représentant 15 % de l'échantillon en volume, ce qui correspond à une estimation de 2106 pour le total dans l'échantillon
- 3) dénombrement dans le reste de l'échantillon = 1359, ce qui correspond à un total réel de 1964

- 4) la précision indiquée serait la même que dans le premier exemple, soit 8,5 %; la justesse indiquée serait de -1,9 % et +7,2 % respectivement pour l'échantillon A et B.

Précision entre les sous-échantillons

Différence en % entre deux sous-échantillons (A et B) = $[1 - (\text{dénombrement dans sous-échantillon A} / \text{dénombrement dans sous-échantillon B})] \times 100$

Exemple (repris de la section 3.2)

- 1) dénombrement dans sous-échantillon A = 289
- 2) dénombrement dans sous-échantillon B = 316
- 3) la précision indiquée pour ces deux sous-échantillons serait de 8,5 %, soit $(1 - [289/316]) \times 100$.

4. 0 Références bibliographiques

Anderson, A.M. 1990. Selected methods for the monitoring of benthic invertebrates in Alberta Rivers. Environmental Quality Monitoring Branch, Environmental Assessment Division, Alberta Environment, Edmonton Alberta. 41p.

Barbour, M.T. and J. Gerritsen. 1996. Subsampling of benthic samples: a defense of the fixed count method. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 15:386-391.

Barbour, M.T., J. Gerritsen, B.D. Snyder and J.B. Stribling. 1999. Rapid Bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: Periphyton, benthic macroinvertebrates, and fish, 2nd Ed. EPA 841-B-99-002. US EPA, Office of Water, Washington, D.C.

Cao, Y., D. Williams and N. Williams. 1998. How important are rare species in aquatic community ecology and bioassessment? *Limn. Oceanogr.* 43:1403-1409.

Carter, J.L. and V.H. Resh. 2001. After site selection and before data analysis: sampling, sorting, and laboratory procedures used in stream benthic macroinvertebrate monitoring programs by USA state agencies. *J.N. Am. Benthol. Soc.* 20:658-682.

Caton, L.W. 1991. Improved subsampling methods for the EPA rapid bioassessment benthic protocols. *Bull. N. Am. Benthol. Soc.* 8:317-319.

Ciborowski, J.H. 1991. Estimating processing time of stream benthic samples. *Hydrobiologia* 222: 101-107.

Charles, D.F., S.S. Dixit, B.F. Cumming and J.P. Smol. 1991. Variability in diatom and chrysophyte assemblages and inferred pH: Paleolimnological studies of Big Moose Lake, New York. USA. *J. Paleolimnol.* 5:267-284.

Courtemanch, D.L. 1996. Commentary on the subsampling procedures used for rapid bioassessments. *J.N. Am. Benthol. Soc.* 15: 381-385.

Cuffney, T.F., M.E. Gurtz and M.R. Meador. 1993. Guidelines for the processing and quality assurance of benthic invertebrate samples collected as part of the national water-quality assessment program. USGS OFR 93-406.

Doberstein, C.P., J.R. Karr and L.L. Conquest. 2000. The effect of fixed-count subsampling on macroinvertebrate biomonitoring in small streams. *Freshwater Biology* 44:355-371.

Downing, J.A. 1979. Aggregation , transformation and the design of benthos sampling programs. *J. Fish. Res. Board. Can.* 36:1454-1463.

Eaton, L.E. and D.R. Lenat. 1991. Comparison of a rapid bioassessment method with North Carolina's qualitative macroinvertebrate collection method. J. N. Am. Benthol. Soc. 10:335-338.

Elliott, J.M. 1977. Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. 2nd. Ed. Freshw. Biol. Assoc. Sci. Publ. 25:160p.

Environment Canada. 2002. (*in prep*). A new cylinder subsampler for use with field or laboratory benthic macroinvertebrate samples. Contribution de l'INRE n° XX-XXX., Environnement Canada, INRE, Saskatoon (Sask.).

Growns, J.E., B.C. Chessman, J.E. Jackson and D.G. Ross. 1997. Rapid assessment of Australian rivers using macroinvertebrates: cost and efficiency of 6 methods of sample processing. J. N. Am. Benthol. Soc. 16:682-692.

Hannaford, M.J. and V.H. Resh. 1995. Variability in macroinvertebrate rapid-bioassessment surveys and habitat assessments in a northern California stream. J. N. Am. Benthol. Soc., 14: 430-439.

Hickley, P. 1975. An apparatus for subdividing benthos samples. Oikos 26:92-96.

Hilsenhoff, W.L. 1987. An improved biotic index of organic stream pollution. Great Lakes Entomol. 20:31-39.

Hilsenhoff, W.L. 1988. Rapid field assessment of organic pollution with a family-level biotic index. J. N. Am. Benthol. Soc. 7: 65-68.

Howmineer, R.P. 1972. Effects of preservatives on seights of some common macrobentic invertebrates. Trans. Am. Fish. Soc. 102: 743-746.

Klattenberg, R.P. 1975. A plexiglass subsampling box for large benthos samples. Progressive Fish Culturist 37:165.

Klemm, D.J., P.A. Lewis, F.Fulk, and J.M. Lazorchak. 1990. Macroinvertebrate field and laboratory methods for evaluating the biological integrity of surface waters. US EPA/600/4-90/030

Kreis, R.G., Jr. 1986. Variability study Section 17. In: Charles, E.F. and R.R. Whitehead (eds.), Paleocological investigation of recent lake acidification (PIRLA): methods and project description. Electric Power Research Institute Palo Alto California.

Kreis, R.G., Jr. 1989. Variability Study – Interim Results. Section 4. In: Charles, E.F. and R.R. Whitehead (eds.), Paleocological investigation of recent lake acidification (PIRLA): 1983-1995: Interim Report. Electric Power Research Institute Palo Alto California.

Larsen, D.P. and A.T. Herlihy. 1998. The dilemma of sampling streams for macroinvertebrate richness. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 17:359-366.

Lenat, D.R., 1988. Water quality assessment of streams using a qualitative collection method for benthic macroinvertebrates. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 7:222-233.

Leuven R.S.E.W., Brock, T.C.M., and H.A.M. van Druten. 1985. Effects of preservative on dry and ash-free dry weight biomass of some common aquatic macroinvertebrates. *Hydrobiologia* 127:151-159.

Lund, J.W.G., C. Kipling and E.S. Le Cren. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11:143-170.

Marchant, R. 1989. A subsampler for samples of benthic invertebrates. *Bull. Aust. Soc. Limnol.* 12:49-52.

Mason, W.T. Jr. 1991. Sieve sample splitter for benthic invertebrates. *J. Fresh.Ecol.* 6:445-449.

Meyer, E. 1990. A simple subsampling device for macroinvertebrates with general remarks on the processing of stream benthos sampling. *Arch. Hydrobiol.* 117:309-318.

Needham, J.G. and P.R. Needham. 1962. A guide to the study of freshwater biology. Holden-Doug Inc., San Francisco. CA. 108p.

Norris, R.H., E.P. McElravy and V.H. Resh. 1996. The sampling problem. p. 184-208. In: Petts, G. and P. Calow (eds). *River Biota Diversity and Dynamics*. Blackwell Science Ltd. Oxford U.K.

Plafkin, J.L., M.R. Barbour, K.D. Porter, S.K. Gross, and R.M. Hughes. 1989. Rapid bioassessment protocols for use in streams and rivers: benthic macroinvertebrates and fish. U.S. EPA., EPA/444/4-89-001.

Resh, V.H., D.M. Rosenberg and J.W. Feminella. 1985. The processing of benthic samples: responses to the 1983 NABS questionnaire. *Bull. N. Amer. Benthol. Soc.* 2: 5-11.

Resh, V.H. and E.P. McElvry. 1993. Contemporary quantitative approaches to biomonitoring using benthic macroinvertebrates. p 159-194 in: D.M. Rosenberg and V.H. Resh (eds.). *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman and Hall. New York.

Rossillon, D. 1987. About the separation of benthos from stream samples. *Arch. Hydrobol.* 110: 469-475.

Sebastien, R.J., D.M. Rosenberg and A.P. Wiens. 1988. A method for subsampling unsorted benthic macroinvertebrates by weight. *Hydrobiologia* 157:69-75.

Sodergren, S. 1974. A simple subsample for stream-bottom fauna samples. *Arch. Hydrobiol.* 73: 549-551.

Somers, K.M., R.A. Reid, and S.M. David. 1998. Rapid Biological assessments: how many animals are enough? *J. N. Am. Benthol. Soc.* 17:348-358.

Taylor, B.R., and R.C. Bailey. 1997. Technical evaluation on methods for benthic invertebrate data analysis and interpretation, final report. AETE project 2.1.3. National Resources Canada, CANMET, Ottawa ON., 26pp. (Résumé en français : Évaluation technique des méthodes d'analyse et d'interprétation des données sur les invertébrés benthiques. Projet ETIMA 2.1.3. Ressources naturelles Canada, CANMET, Ottawa.)

Vinson, M.R. & C.P. Hawkins. 1996. Effects of sampling area and subsampling procedure on comparisons of taxa richness among streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 15:392-399.

Waters, T.F. 1969. Subsampler for dividing large samples of Stream invertebrate drift. *Limnological Oceanogr.* 14:813-815.

Wrona, F.J., Culp, J.M., & Davies, R.W. 1982. Macroinvertebrate subsampling: a simplified apparatus and approach. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:1051-1054.

Annexe A

Examen des protocoles de traitement des échantillons benthiques et des questions d'AQ/CQ

Nancy E. Glozier, J.M. Culp, Daryl Halliwell

Introduction

Les guides techniques préparés pour les programmes ESEE tant pour les pâtes et papiers que les mines de métaux sont des documents d'orientation pour le traitement des échantillons en laboratoire, les protocoles de sous-échantillonnage et l'assurance de la qualité. Cependant, il manquait les protocoles détaillés et les critères d'acceptabilité pour le sous-échantillonnage. La qualité du tri benthique en laboratoire peut influencer sur l'exactitude des mesures terminales pour la communauté d'invertébrés benthiques, requis aux fins de l'évaluation des effets exercés sur l'habitat du poisson (c.-à-d. la densité totale des invertébrés, la richesse en taxons, l'indice de diversité de Simpson et le coefficient de Bray-Curtis). Si les protocoles dans une étude donnée sont cohérents, les erreurs mineures dans l'efficacité du tri sont moins problématiques pour ce qui est de l'interprétation des effets à une usine ou à une mine particulière. Cependant, il peut y avoir une source significative d'erreur dans l'interprétation pour les usines ou mines prises individuellement ou pour les analyses effectuées à grande échelle (c.-à-d. nationale ou régionale) si les erreurs de traitement des échantillons se produisent entre les échantillons, les sites ou les usines.

Pour caractériser la portée des difficultés potentielles de traitement ou de sous-échantillonnage, la première étape a consisté en un examen détaillé des méthodes présentées dans les rapports d'interprétation du programme d'ESEE des pâtes et papiers (PP) du cycle 2. L'information extraite de ces rapports comprenait les éléments suivants : nombre d'études où un sous-échantillonnage en laboratoire a été effectué; type de sous-échantillonnage; disposait-on de protocoles détaillés; les facteurs de correction de la densité étaient-ils donnés et calculés de façon appropriée; l'erreur de sous-échantillonnage (précision et/ou justesse) a-t-elle été indiquée et calculée de façon appropriée; enfin, les critères d'AQ/CQ pour le tri et le sous-échantillonnage ont-ils été établis et respectés dans le cadre de ces études. Le but du présent examen n'était pas de réinventer les protocoles établis, mais d'examiner le niveau de détail des documents d'orientation actuels et d'établir si les rapports d'interprétation résultants donnent assez d'information pour permettre l'évaluation de la qualité des données. On a caractérisé les domaines où une orientation plus spécifique pourrait être profitable pour le programme de SEE, ce qui a conduit à une ébauche révisée du document d'orientation pour les protocoles de tri des invertébrés benthiques, concernant spécifiquement les sections 6.2.2 du guide technique pour les PP et 5.2.2 du document d'orientation pour les mines de métaux (MM). L'examen qui suit couvre trois questions importantes examinées d'après

les rapports d'interprétation du cycle 2 : l'efficacité du tri; les méthodes de sous-échantillonnage; les calculs pour déterminer la précision/justesse du sous-échantillonnage.

Efficacité du tri

Le traitement de base des échantillons d'invertébrés benthiques consiste notamment à trier les organismes pour les séparer de grandes quantités de débris, opération qui est très longue. Lors de cette phase de tri, il se produit inévitablement des erreurs quels que soient les soins apportés au traitement. La première composante d'AQ/CQ du traitement des échantillons d'invertébrés benthiques est l'obligation d'évaluer l'efficacité du tri (c.-à-d. la proportion de la totalité des organismes extraits de l'échantillon par le tri). Une efficacité élevée dans le tri permettra de calculer les points de référence avec une fiabilité raisonnable et sans biais entre les échantillons. Il est recommandé qu'aux fins de l'évaluation de l'efficacité du tri pour les programmes de SEE PP et MM, au moins 10 % de tous les échantillons provenant de chaque étude soient soumis à un nouveau tri et que tous les organismes présents soient dénombrés lors de ce second tri. Un tri est jugé acceptable si > 90 % du nombre total d'organismes sont récupérés lors du premier tri. Dans un examen des rapports d'interprétation du programme de SEE du deuxième cycle, 98 % de toutes les études examinées (87 usines) indiquaient que cette méthode de tri avait été suivie pour le processus d'AQ/CQ. Cependant, seulement 58 % de ces usines ont déclaré l'efficacité réelle atteinte pour les échantillons d'une étude donnée. De celles qui ont indiqué l'efficacité, toutes atteignaient la cible de > 90 % et la plupart (75 %) obtenaient > 95 %. En supposant que les efficacités non déclarées de tri spécifiques à une étude ne représentent pas des efficacités inférieures à la cible, cet aspect du tri benthique pour l'AQ/CQ semble avoir été bien compris et correctement appliqué. Cependant, les efficacités du tri devraient être déclarées pour toutes les études à l'aide des tableaux normalisés fournis dans le document d'orientation révisé.

Méthodes de sous-échantillonnage

Si le protocole de traitement comprend le sous-échantillonnage de l'échantillon, la seconde composante de l'AQ/CQ comporte une évaluation de l'erreur de sous-échantillonnage. Comme pour le tri de base des échantillons benthiques, il y aura un certain niveau d'erreur dans toute méthode de sous-échantillonnage. Dans les méthodes de sous-échantillonnage, l'erreur préoccupante est le degré de justesse avec lequel la méthode estime le nombre total d'organismes dans l'échantillon entier. La similarité entre deux sous-échantillons (c.-à-d. la précision) est moins importante que la justesse de l'estimation. Cela étant dit, si tous les sous-échantillons étaient traités à partir d'un seul échantillon et si la précision était élevée pour tous les sous-échantillons, la justesse pour chacun serait elle aussi élevée. Par contre, si la précision est faible ou variable, la justesse variera d'un sous-échantillon à l'autre. Dans un programme approprié d'AQ/CQ, chacune de ces deux mesures d'erreur de sous-échantillonnage devrait donc être évaluée.

Pour évaluer les programmes de sous-échantillonnage utilisés dans le programme d'ESEE, on a examiné de façon détaillée 83 études d'usines. Près de 90 % de toutes les études examinées (83 usines) utilisaient un certain type de sous-échantillonnage pour faciliter le traitement des échantillons d'invertébrés benthiques (tableau 1). Bien que les méthodes de sous-échantillonnage ne soient pas toutes identiques, l'objectif consiste essentiellement à fractionner un grand échantillon en plusieurs portions, dont chacune est représentative de l'échantillon entier. Ces portions plus petites sont traitées plus efficacement et à un coût moins élevé tout en donnant des estimations fiables du nombre total d'organismes dans l'échantillon. Les trois méthodes les plus courantes fractionnent les échantillons selon la surface, le poids ou le volume de l'échantillon et elles conviennent pour toute une gamme de types d'échantillons. La majeure partie des études du cycle 2 utilisaient une méthode de sous-échantillonnage basée sur la surface. Il existe diverses techniques basées sur la surface, mais toutes estiment le nombre total d'organismes dans un échantillon par la proportion aérienne extraite au-dessus d'une surface plane. Les autres méthodes communément employées consistent à fractionner l'échantillon selon le poids ou le volume. 23 % des études n'indiquaient pas quelle méthode avait été employée, en dépit du fait qu'elles avaient utilisé le sous-échantillonnage pour faciliter le tri des échantillons. Plusieurs autres techniques (tableau 1, autres méthodes) ont été décrites brièvement, mais leur efficacité n'est pas prouvée, vu qu'il n'existe pas d'évaluation à leur sujet dans la documentation scientifique. Enfin, la méthode à dénombrement préétabli, une méthode de sous-échantillonnage largement employée aux États-Unis dans les programmes d'échantillonnage sur le terrain, n'a été utilisée dans aucun des rapports d'ESEE examinés.

Tableau 1 Types de sous-échantillonnages utilisés dans les études de 83 usines du cycle 2, examinées

Méthode de sous-échantillonnage	% d'études	Notes
Aucune	11	• tri de l'échantillon entier
Surface	35	• % d'échantillons prélevés selon la surface • diverses méthodes d'après Cuffney <i>et al.</i>, 1993
Poids	18	• % d'échantillons prélevés selon le poids des débris • Sebastien <i>et al.</i>, 1988
Volume	10	• % d'échantillons prélevés selon le volume, les animaux étant mélangés aléatoirement dans le cône d'Imhoff • Wrona <i>et al.</i>, 1982
Autres méthodes	3	• En général, fractionnement de

		l'échantillon par d'autres moyens, non documentés par la littérature primaire
Inconnue/non spécifiée	23	• méthodes non spécifiées

Précision et justesse du sous-échantillonnage

Quelle que soit la technique de sous-échantillonnage utilisée, il faut étayer la justesse de l'estimation si on veut être certain que les données sont comparables entre les études et à l'intérieur de celles-ci. De fait, le principal critère pour évaluer une technique de sous-échantillonnage consiste en une évaluation de sa capacité à estimer avec justesse les nombres et les types d'organismes dans un échantillon. On a examiné les erreurs de sous-échantillonnage données dans 57 études d'usines du cycle 2 pour le secteur PP. Malheureusement, plus de la moitié de ces études (56 %) ne déclarait pas l'erreur associée à la technique de sous-échantillonnage utilisée. Parmi ceux qui donnaient l'erreur, la majorité (72 %) indiquait la précision obtenue par comparaison de deux sous-échantillons. Par exemple :

- 1) dénombrement dans le sous-échantillon A = 289
- 2) dénombrement dans le sous-échantillon B = 316
- 3) la précision donnée pour ces deux sous-échantillons serait de 8,5 %
 $(1 - [89/316]) \times 100$.

Si la même précision s'appliquait à tous les sous-échantillons de cet échantillon particulier, alors la justesse serait elle aussi proche de 9 %. Cependant, en l'absence du tri du reste des échantillons, il n'est pas possible de déterminer la justesse. Les études qui indiquaient la justesse pour les sous-échantillons, ont suivi les recommandations du guide technique. Il y a eu tri de plusieurs sous-échantillons pour 10 % de tous les échantillons, le reste de l'échantillon faisant ensuite l'objet d'un tri dans son intégralité. L'erreur de sous-échantillonnage a été calculée par comparaison des estimations provenant des sous-échantillons au dénombrement réel. Par exemple :

- 1) dénombrement dans le sous-échantillon A = 289, représentant 15 % de l'échantillon en volume, ce qui correspond à une estimation de 1927 pour le total dans l'échantillon
- 2) dénombrement dans le sous-échantillon B = 316, représentant 15 % de l'échantillon en volume, ce qui correspond à une estimation de 2106 pour le total dans l'échantillon
- 3) dénombrement dans le reste de l'échantillon = 1359, ce qui correspond à un total réel de 1964
- 4) la précision indiquée serait la même que dans le premier exemple, 8,5 %
- 5) la justesse indiquée serait de -1,9 % et +7,2 % respectivement pour l'échantillon A et B.

Ce type d'information d'AQ/CQ est essentiel si on veut être sûr que le programme de sous-échantillonnage estime avec justesse le nombre d'organismes dans l'échantillon. Il faut enfin noter que, dans les rapports d'interprétation du cycle 2, les facteurs de correction utilisés pour estimer le nombre total d'organismes dans un échantillon n'ont généralement pas été indiqués. Même s'il ne s'agit là que d'un simple calcul, particulièrement pour les systèmes de sous-échantillonnage qui divisent l'échantillon simplement en deux, ces facteurs devraient néanmoins être indiqués.

En plus de l'examen des rapports d'interprétation du cycle 2, on a également examiné les guides techniques des PP et MM afin de déterminer si d'autres recommandations permettraient une présentation plus cohérente des résultats d'AQ/CQ. Comme il semble y avoir des fluctuations considérables sur la façon dont l'erreur est calculée et présentée, une refonte des sections 6.2.2 pour les PP et 5.22 pour les MM du document d'orientation est en cours. Cela comprend un examen et une description détaillée des techniques de sous-échantillonnage et des méthodes de présentation proposées pour l'AQ/CQ. Un ajout important à ce document d'orientation : une recommandation spécifique de niveau acceptable d'erreur pour le sous-échantillonnage en laboratoire, critère qui manquait dans les versions précédentes. C'est peut-être l'absence de ce critère qui explique qu'aucune des études de cycle 2 qui indiquait une erreur (que ce soit de précision ou de justesse) ne spécifiait des mesures correctives en cas de niveau d'erreur inacceptable. L'objectif premier du sous-échantillonnage est de réduire les efforts considérables consentis pour le traitement des échantillons benthiques, mais pas aux dépens de la qualité des données. Pour l'efficacité de base du tri, on a fixé à 10 % l'erreur acceptable. Pour l'erreur de sous-échantillonnage, la majorité des études du cycle 2 utilisaient une précision de 20 %. Autrement dit, si la précision entre deux sous-échantillons était $< 20\%$, l'erreur était jugée acceptable (voir l'exemple pour la précision ci-dessus). Même si ce niveau de précision était conseillé dans les documents d'orientation pour déterminer le nombre d'échantillons ponctuels (c.-à-d. de sous-échantillons prélevés sur le terrain) à prélever à une station donnée, il n'a pas été conseillé explicitement comme niveau acceptable pour le sous-échantillonnage en laboratoire. Le guide révisé spécifie une méthode qui établit ces règles d'acceptabilité et des mesures de suivi si les protocoles de sous-échantillonnage ne respectent pas ces règles.