

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DES RECHERCHES OCEANIQUES

par Robert de Serres

RECUEIL DES TECHNIQUES
UTILISEES POUR L'ETUDE ECOLOGIQUE
DES SITES DE CENTRALES NUCLEAIRES
SUR LES COTES FRANCAISES DE MANCHE ET ATLANTIQUE



IFREMER - Centre de BREST SDP
BP 337 - 29273 BREST CEDEX
Tél. 98 22 40 40 - Telex 940627 F

DERO-86.24-EL

Electricité de France

TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE ECOLOGIQUE DES SITES
DE CENTRALES NUCLEAIRES SUR LES COTES FRANCAISES
DE MANCHE ET ATLANTIQUE

Direction des Etudes et Recherches Océaniques
Environnement Littoral

1985

Ce volume reprend les techniques de prélèvements et analyses utilisées par IFREMER et ses partenaires pour l'étude écologique des sites de centrales nucléaires des côtes françaises de Manche et Atlantique, selon le plan suivant :

I. HYDROLOGIE (N. DEGROS, Station Marine de Wimereux) -
44 pages

II. PHYTOPLANCTON ET PRODUCTION PRIMAIRE (H. GROSSEL,
IFREMER/DERO/EL/Wimereux) - 9 pages

III. MICROBIOLOGIE (R. DELESMONT, Institut Pasteur de
Gravelines) - 11 pages

IV. ZOOPLANCTON (G. LE FEVRE-LEHÖERFF,
IFREMER/DERO/EL/Brest) - 24 pages

V. BENTHOS SUBTIDAL ET INTERTIDAL (J.M. DEWARUMEZ, Station
Marine de Wimereux) - 12 pages

VI. PHYTOBENTHOS (T. BELSHER, IFREMER/DERO/EL/Roscoff) -
8 pages

CHAPITRE I

HYDROLOGIE

Nicole DEGROS

Station Marine de Wimereux

S O M M A I R E

TECHNIQUES OCEANOGRAPHIQUES : DOMAINE PELAGIQUE

I - Introduction	1
II - Techniques de prélèvements hydrologiques	1
II.1 Prélèvements hydrologiques	1
II.2 Spécificité des techniques relatives à certains paramètres	5
II.2.1. Oxygène dissous	5
II.2.2. Ammoniac dissous	5
II.2.3. pH	6
II.2.4. Salinité	6
II.2.5. Sels nutritifs	7
III - Techniques de mesures et d'analyses hydrologiques	8
III.1 Paramètres physicochimiques	8
III.1.1. Température	8
III.1.2. Transparence de l'eau	10
III.1.3. Turbidité	10
III.1.4. Matières en suspension totales	13
III.1.5. Salinité	13
III.1.6. Mesure électrochimique du pH	15
III.1.7. Oxygène dissous	17
III.1.8. Sels nutritifs dissous	21
III.1.8.1. Dosage des ions ammonium	21
III.1.8.2. Dosage des autres sels nutritifs	21
III.1.8.2.1. Nitrites	24
III.1.8.2.2. Nitrates	24
III.1.8.2.3. Phosphates	24
III.1.8.2.4. Silicium dissous	24
III.1.8.3. Remarques sur la précision et la signifi- cation des dosages des éléments nutritifs dissous	25
III.2. Paramètres biologiques	26
III.2.1. Les pigments chlorophylliens	26
III.2.1.1. Précautions particulières	26
III.2.1.2. Filtration	28
III.2.1.3. Extraction des pigments	28
III.2.1.4. Méthode spectrophotométrique du dosage de la chlorophylle a	29
III.2.1.5. Méthode fluorimétrique	32
III.2.1.6. Détermination de la concentration en phéo- pigments	33
III.2.1.7. Indice de diversité pigmentaire	34
III.2.1.8. Comparaison des méthodes spectrophotomé- trique et fluorimétrique	34
III.2.2. Carbone et azote organiques particuliers	35

III.2.2.1. L'analyseur élémentaire CARLO ERBA, modèle 1106	35
III.2.2.2. Préparation des échantillons	37
III.2.2.3. Analyse	39
III.2.2.4. Exploitation des résultats	39
III.2.2.5. Précision des mesures	40

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Bouteille à clapets de type NISKIN (bouteille fermée)	1
Figure 2 : Mise à l'eau des bouteilles à prélèvement (bouteille ouverte)	2
Figure 3 : Répartition de l'eau prélevée dans les différents flacons	5
Figure 4 : Système de filtration sous vide	4
Figure 5 : Système de filtration sous pression	4
Figure 6 : Capsulage des cannettes en vue d'une mesure ultérieure de la salinité	7
Figure 7 : Congélateur portatif	7
Figure 8 : Commutateur de sélection de sonde	8
Figure 9 : Thermomètre à renversement : vue de détail du capillaire	9
Figure 10 : Mesure de la transparence de l'eau au moyen du disque de Secchi	9
Figure 11 : Mesure de la turbidité	11
Figure 12 : Echelles de correction du turbidimètre par rapport à l'eau Ultra-Pure (Système Milli Q) le 25.10.82	11
Figure 13 : Confrontation des mesures de turbidité aux mesures de matières en suspension totales	12
Figure 14 : Vue du salinomètre BECKMAN RS 7C	14
Figure 15 : Mesure électrochimique du pH	16
Figure 16 : Dosage de l'oxygène dissous : addition des réactifs à l'aide de pipettes automatiques	16
Figure 17 : Dosage de l'oxygène dissous au moyen d'une burette à piston motorisé, DOSIMAT E 535	18
Figure 18 : Dosage de l'oxygène par potentiométrie : Détermination du point de fin de réaction (amélioration de la sensibilité par polarisation de l'électrode)	19
Figure 19 : Dosage de l'ammoniac dissous : addition des réactifs au moyen de dispensettes BRAND	20
Figure 20 : Autoanalyseur Technicon	20
Figure 21 : Vue d'ensemble de l'autoanalyseur II Technicon 4 chaînes couplées à un microprocesseur Hewlett-Packard	21
Figure 22 : Circulation des fluides à l'intérieur d'une chaîne d'analyse automatique Technicon	22
Figure 23 : Enregistrements et courbes d'étalonnage obtenus pour quelques dosages effectués sur Autoanalyseur II Technicon	23
Figure 24 : Analyse de la chlorophylle : dépôt de carbonate de magnésium sur filtre Whatman avant filtration	27
Figure 25 : Analyse de chlorophylle : Système de filtration sous pression permettant de conserver les échantillons à l'abri de la lumière	27
Figure 26 : Spectres d'absorption dans l'acétone à 90%	30
a) d'un extrait de phytoplancton	
b) de chlorophylle a purifiée	

Figure 27	: Spectrophotomètre BECKMAN UV 24	31
Figure 28	: Fluorimètre TURNER Modèle 111	31
Figure 29	: Comparaison entre les concentrations de chlorophylle a calculées soit à partir de la fluorescence totale, soit à partir de la densité optique (SCOR UNESCO, 1966) d'extraits, dans l'acétone à 90 % de communautés de phytoplancton.	
Figure 30	: Analyseur C.H.N. CARLO ERBA - Modèle 1106	36
Figure 31	: Schéma de l'analyseur "CARLO ERBA" - Modèle 1106	36
Figure 32	: Exemple d'enregistrement obtenu avec l'analyseur C.H.N.	38
Figure 33	: Vérification de la linéarité des catharomètres (gamme : 0,1 à 0,8 µg de cyclohexone	40

DOMAINE PÉLAGIQUE

I - INTRODUCTION

Les masses d'eau sont caractérisées par divers paramètres physico-chimiques tels que : température, transparence de l'eau, turbidité, matières en suspension, salinité, pH, oxygène dissous, sels nutritifs ; et des paramètres biologiques tels que : pigments photosynthétiques, carbone et azote organique particulaires, populations planctoniques, productions primaire et secondaire, abondance bactérienne, etc...

II - TECHNIQUES DE PRELEVEMENTS HYDROLOGIQUES

II - 1. Prélèvements hydrologiques*

L'échantillonnage nécessaire à l'étude des divers paramètres hydrologiques est réalisé à l'aide de bouteilles à prélèvements, bouteilles à clapets de type NISKIN par exemple. (Fig. 1).

Support du
thermomètre à
renversement.

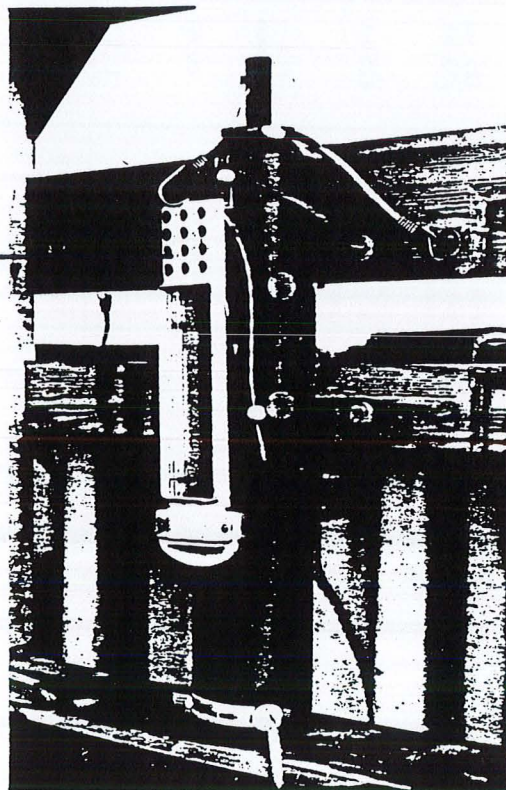


Figure 1 :
Bouteille à clapets
de type NISKIN
(bouteille fermée)

* Traits verticaux de zooplancton et prélèvements hydrologiques peuvent être effectués simultanément, lorsque le treuil de pêche du bateau est équipé d'une poulie permettant par l'intermédiaire d'une poulie compteuse, le renvoi d'un câble d'acier de 4,5 mm de diamètre au niveau d'une potence hydrologie, cas du N.O. SEPIA II.

TABLEAU I - CHRONOLOGIE DE L'ECHANTILLONNAGE HYDROLOGIQUE (DE LA BOUTEILLE DE PRELEVEMENTS A L'ANALYSE)

CONSERVATION RECOMMANDEE avant analyse		CONDITIONNEMENT RECOMMANDE				BOUTEILLE A PRELEVEMENTS	
Durée maximale recommandée	Conditions	Type de flacon	Volume	Remplissage	Nombre de répliquats	Prise directe	
1 mois	à l'obscurité, complètement immergés dans l'eau de mer en évitant les contractions thermiques	verre à col rodé bouché émeri	125 ml	Total	3	1 Oxygène	Préfiltration 200 µ
quelques jours	Obscurité et température ambiante	verre à col rodé bouché émeri	125 ml	partiel : 105 ml	2	2 Ammoniac	
5 à 6 heures	au frais, à l'obscurité	plastique à double capsulage et large ouverture	125 ml	Total	1	3 pH	
1 à 2 mois	à l'obscurité, au frais, en évitant les grands écarts de température	verre : cannette à capsulage hermétique	125 ou 133 ml	laisser une bulle d'air	1	4 Salinité	
	à l'abri de la lumière - fixé au formol ou lugol	verre ou plastique à double capsulage	125 ml	laisser une bulle d'air	1 ou 2	5 Phytoplancton	
la plus réduite possible avant incubation	au frais et à l'obscurité	plastique	1 l minimum		1	6 Production primaire	Filtration 0,45 µ sous pression ou vide contrôlés
quelques mois	congélation	plastique à double capsulage	60 ml	3/4	2	7 Autres sels nutritifs (NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SiO ₃)	
24 heures	au frais, à l'obscurité		1 l		1	8 Turbidité	
		Type de filtre	Volume				
quelques heures	à 4°C et à l'obscurité	fibres de verre	1 l		2		
		filtres Whatman GF/C	1 l				
1 à 2 mois	à l'obscurité, en tube bouché au congélateur						
24 heures	au frais, à l'obscurité	Filtres Gelman acétate de cellulose GA 6	1 l		1		- M.E.S. (Matières en suspension totales)
1 mois	étuve à 45°C	fibres de verre	jusqu'à colmatage du filtre		1 ou 2		- Carbone et Azote organique

Ordre chronologique des prélèvements

Ces bouteilles (de contenance 5 ou 8 litres), équipées de thermomètres à renversement sont placées en série le long d'un câble d'acier lesté, et descendues ouvertes à l'aide d'un treuil. La fermeture au moyen de messagers permet d'échantillonner la colonne d'eau aux profondeurs désirées (profondeur contrôlée par exemple au moyen d'une poulie compteuse) pratiquement au même instant.

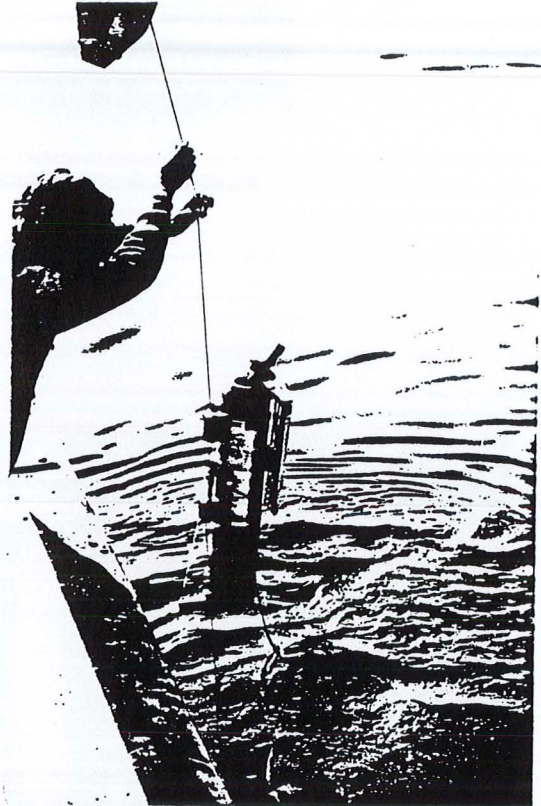


Figure 2 :
Mise à l'eau des bouteilles
à prélèvement (bouteille
ouverte).

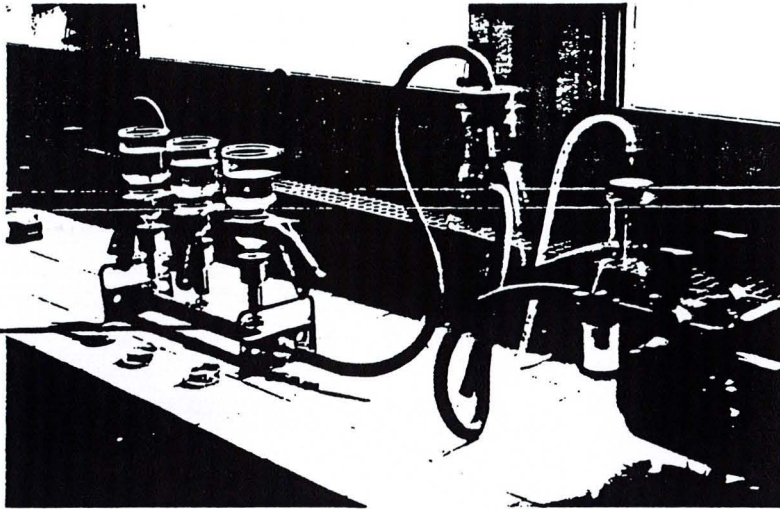
On prend soin d'effectuer ces prélèvements en dehors des rejets de refroidissement du moteur.

L'eau ainsi prélevée est immédiatement répartie dans les différents flaconnages (Fig 5) afin d'éviter au maximum la décantation à l'intérieur de la bouteille NISKIN. Cette répartition a lieu dans un certain ordre chronologique permettant de respecter les spécificités de prélèvement relatives à certains paramètres (Tableau I).

Lorsque cela est nécessaire, soit en raison des conditions analytiques (Ammoniac), soit pour une meilleure conservation de l'eau à analyser ou encore pour recueillir le matériel particulaire, l'eau est préfiltrée sur soie de 200 μ ou filtrée, sous vide ou pression contrôlés, sur filtre de porosité 0,45 μ (figs. 3 et 4).

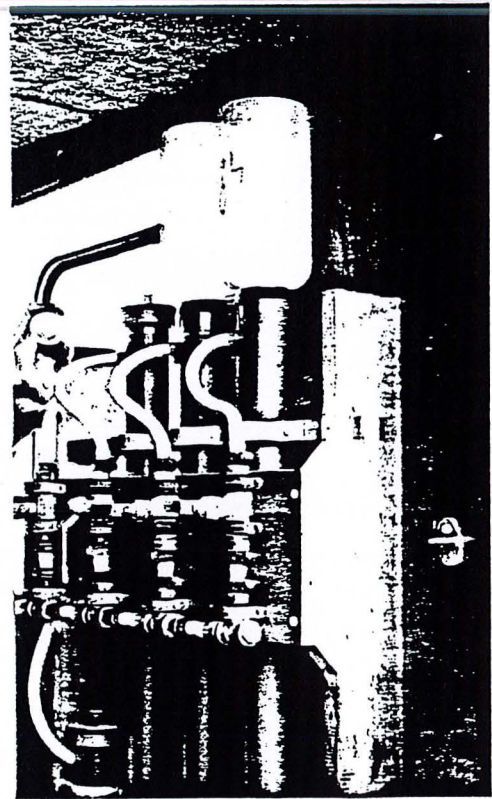
Dans tous les cas, les flacons sont rincés deux ou trois fois avec l'eau à analyser avant le remplissage final.

Rampe de filtration
millipore.



Pompe à
vide

Figure 4 : Système de filtration sous vide



Compresseur équipé d'un manomètre
de contrôle

Figure 5 : Système de filtration sous pression

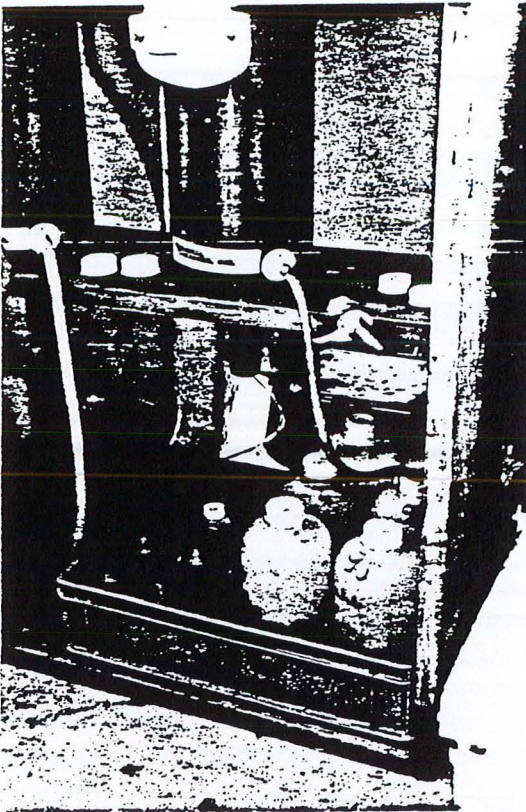


Figure 3 :
Répartition de l'eau prélevée
dans différents flaconnages.

II - 2. Spécificités techniques relatives à certains paramètres

II - 2.1. Oxygène dissous

Les échantillons destinés à l'analyse de l'oxygène dissous sont les premiers pris de la bouteille à prélèvement, le plus rapidement possible après la remontée. Les flacons utilisés sont des flacons en verre à col rodé, bouchés émeri.

Le prélèvement est effectué au moyen d'un tuyau souple plongeant au fond du flacon. Ce tube souple est préalablement purgé d'air, ce qui permet d'éviter d'amener de l'air atmosphérique et d'empêcher tout barbotage avec celui-ci. On laisse couler une quantité double de celle du flacon, donc déborder, on bouche immédiatement en prenant soin de ne pas emprisonner de bulle d'air.

Trois échantillons de 125 ml sont prélevés à chaque niveau.

II - 2.2. Ammoniac dissous

Une attention toute particulière doit être apportée au prélèvement en raison du risque permanent de pollution (atmosphère polluée du laboratoire, fumée de tabac, etc...).

Dans ce but la prise d'échantillon a lieu rapidement après la remontée de la bouteille de prélèvement, immédiatement après celle effectuée pour l'oxygène dissous.

Deux échantillons sont prélevés à chaque niveau dans des flacons en verre à col rodé, bouchés émeri et préalablement rincés plusieurs fois avec de l'eau bidistillée. Des flacons spéciaux marqués au niveau 105 ml correspondant au volume d'échantillon utilisé pour l'analyse sont réservés à cet usage. En effet, contrairement aux autres sels nutritifs, l'analyse est commencée à bord aussitôt après le prélèvement.

L'eau est préfiltrée à la sortie de la bouteille de prélèvement sur une soie de porosité variant entre 40 μ et 200 μ suivant la turbidité de l'eau. Cette préfiltration est abandonnée lors des poussées de *Phaeocystis* car le temps de filtration augmente alors d'une manière telle que l'erreur apportée par les risques de contamination rendent cette technique inopportune.

II - 2.3. pH

Les flacons sont rincés deux fois avec l'eau à analyser avant le prélèvement qui est effectué sans aucune filtration en évitant un brassage avec l'air atmosphérique. Le flacon est rempli complètement sans bulle d'air et bouché hermétiquement (les flacons utilisés sont des flacons plastiques possédant des capsules d'étanchéité).

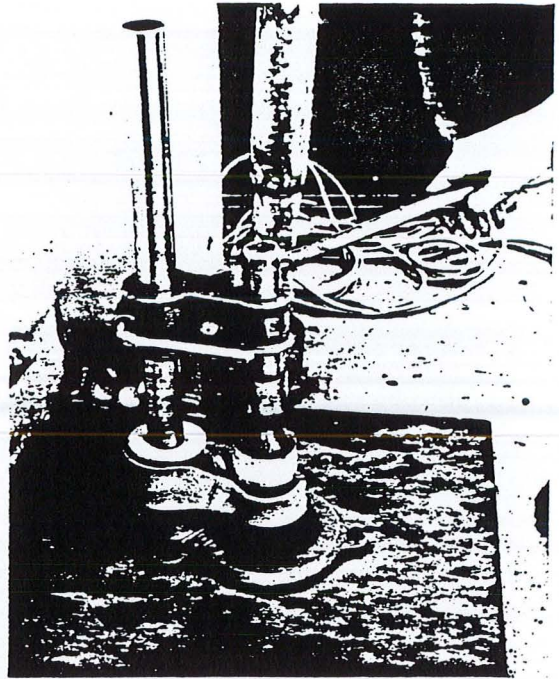
Les échantillons sont conservés dans un endroit frais et à l'obscurité en attendant la mesure qui doit être faite le plus rapidement possible après le prélèvement, c'est-à-dire à bord du bateau lorsque cela est possible ou dès le retour au laboratoire.

II - 2.4. Salinité

L'eau nécessaire aux mesures de salinité est transvasée directement de la bouteille à prélèvement dans des cannettes en verre qui sont immédiatement bouchées hermétiquement à l'aide d'une capsuleuse manuelle. (fig. 6).

On prend soin de remplir la cannette en laissant juste quelques millilitres d'air en prévision de toute dilatation thermique ultérieure. Les échantillons sont conservés à l'abri de la lumière et au frais tout en évitant des variations trop importantes de température.

Figure 6 :
Capsulage des cannettes
en vue d'une mesure ultérieure
de la salinité.

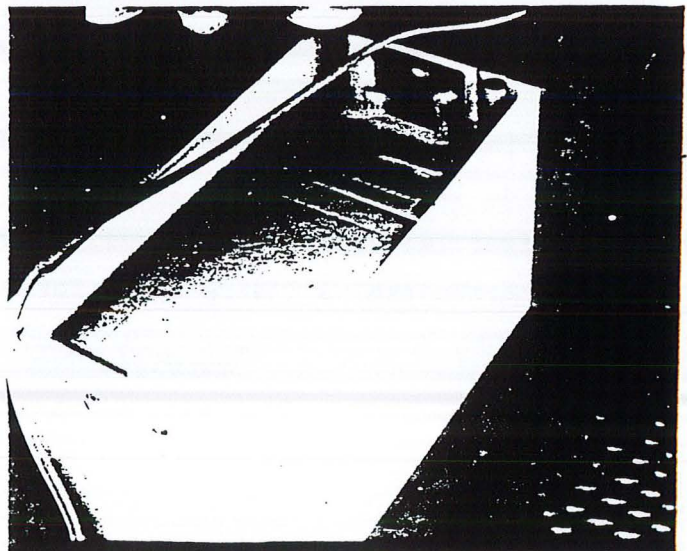


II - 2.5. Sels nutritifs

Excepté pour les prélèvements destinés au dosage des ions ammonium, les échantillons sont immédiatement filtrés sur filtres Gelman GA 6 de porosité $0,45 \mu$ et conservés dans des flacons de polyéthylène de 60 ml possédant un bouchage double (capsule + bouchon vissé). On prend soin d'éviter tout contact de l'échantillon avec la peau, celui-ci étant source de pollution, surtout pour les phosphates.

Les flacons sont ensuite entreposés dans un congélateur portatif permettant, sinon de congeler les échantillons, au moins de les conserver à la température la plus basse possible jusqu'à l'arrivée au laboratoire où la congélation est immédiatement poursuivie.

Figure 7 :
Congélateur portatif.



III - TECHNIQUES DE MESURES ET D'ANALYSES HYDROLOGIQUES

III - 1. Paramètres physico-chimiques

III - 1.1. Température

Elle est mesurée soit au moyen d'un thermomètre à renversement protégé (RICHTER et WIESE) logé dans un support solidaire de la bouteille à prélèvement (fig. 2), soit au moyen d'un thermomètre digital LAUDA R 44 ou encore d'un thermomètre de surface lorsque les conditions de travail ne permettent pas l'utilisation des thermomètres à renversement.

Commutateur de
sélection de sonde.

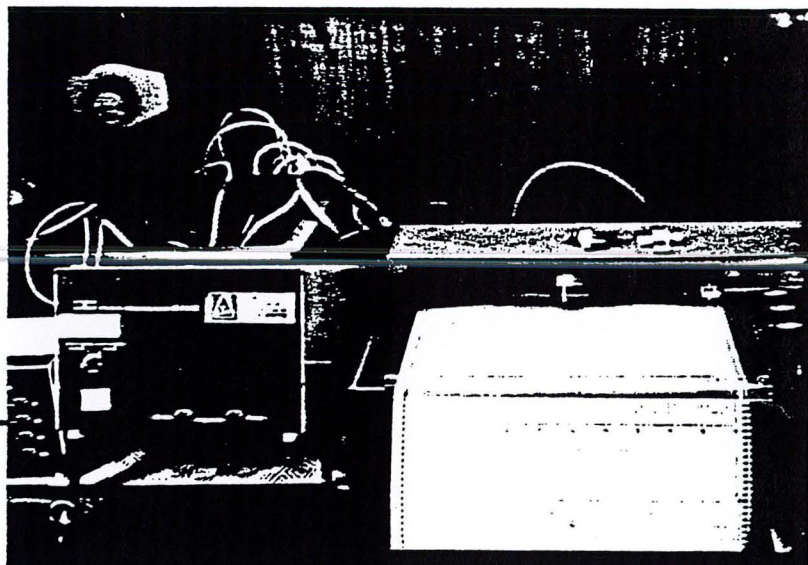


Figure 8 : Thermomètre digital LAUDA R 44.

Le thermomètre à renversement permet d'obtenir la température de l'eau à la profondeur désirée, avec une précision de 3/100° de degré Celsius si on respecte les conditions d'utilisation suivantes :

- laisser se stabiliser le thermomètre *in situ*, une dizaine de minutes avant de déclencher son retournement par l'envoi du message et provoquer ainsi la rupture de la colonne de mercure.
- lire la température avec une loupe NANSSEN seulement 10 mm après la remontée afin de laisser la colonne de mercure se stabiliser à température ambiante.
- corriger les températures lues, à partir du certificat d'étalonnage propre au thermomètre, à l'aide de la formule suivante :

$$T_{\text{corrigée}} = T' + i + c$$

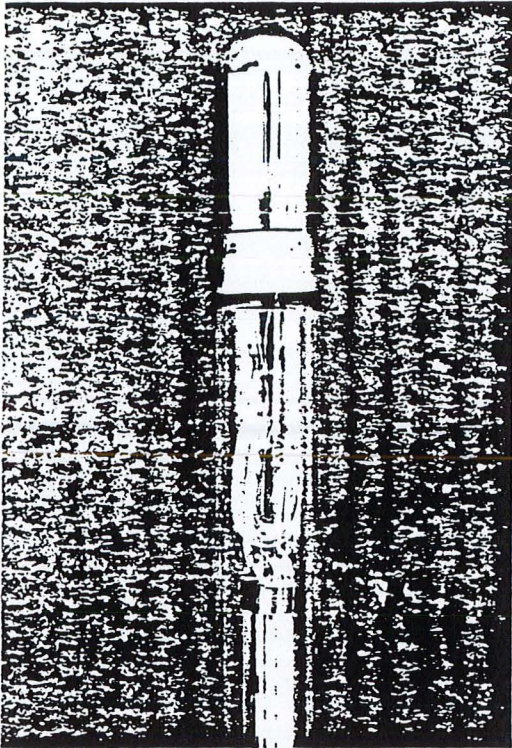


Figure 9 :
Thermomètre à renversement :
vue de détail du capillaire.

Thermomètre — Thermomètre
auxiliaire principal

Figure 10 :
Mesure de la transparence
de l'eau au moyen du
disque de Secchi.



dans laquelle : T' = température du thermomètre principal,
i = erreur du thermomètre principal à la température
considérée,

$$c = \frac{(V_0 + T') (T' - t)}{k - 100}$$

V₀ = volume du réservoir
jusqu'à la graduation 0°C

k = facteur de correction dû
au verre du thermomètre
principal

t = température corrigée du
thermomètre auxiliaire

Le thermomètre digital LAUDA R 44 est un thermomètre électronique équipé de sondes étanches de température qui sont des thermomètres à résistance de platine. Il nous donne une indication immédiate de la température de l'eau à différentes profondeurs au moyen d'un commutateur. (Fig. 11) Il est utilisé comme témoin de situation par rapport à une tache thermique par exemple ou un niveau de référence, et comme appareil de mesure lorsque les conditions météorologiques font dériver le bateau plus rapidement que la masse d'eau que l'on désire échantillonner (l'attente nécessaire à la stabilisation des thermomètres à renversement rendant la mesure non significative). Ses indications sont de l'ordre du centième, mais il ne faut pas lui accorder une précision beaucoup supérieure au dixième après étalonnage.

Le thermomètre de surface gradué au 1/10ème de degré et donnant donc une précision de lecture de l'ordre de 0,05° C est utilisé lors des prélèvements effectués à terre (c'est-à-dire au canal d'amenée et à l'Aa par exemple dans le cas de l'étude du suivi de Gravelines).

III - 1.2. Transparence de l'eau

Elle est quantifiée par la moyenne obtenue entre l'appréciation de la profondeur de disparition et celle de réapparition d'un disque de Secchi, estimée en prenant soin de se placer dans l'ombre du bateau [recommandation d'ATKINS et Coll. (1954)] (Fig. 10).

III - 1.3. Turbidité

Elle correspond aux substances dispersées dans l'eau à l'état colloïdal ou aux particules grossières. Sa mesure s'effectue en utilisant l'effet Tyndall, phénomène de diffusion de la lumière au contact de ces particules, au moyen d'un turbidimètre DRT 1000 fonctionnant comme un néphélomètre (fig. 11). Une lumière incidente polychromatique traverse une cellule

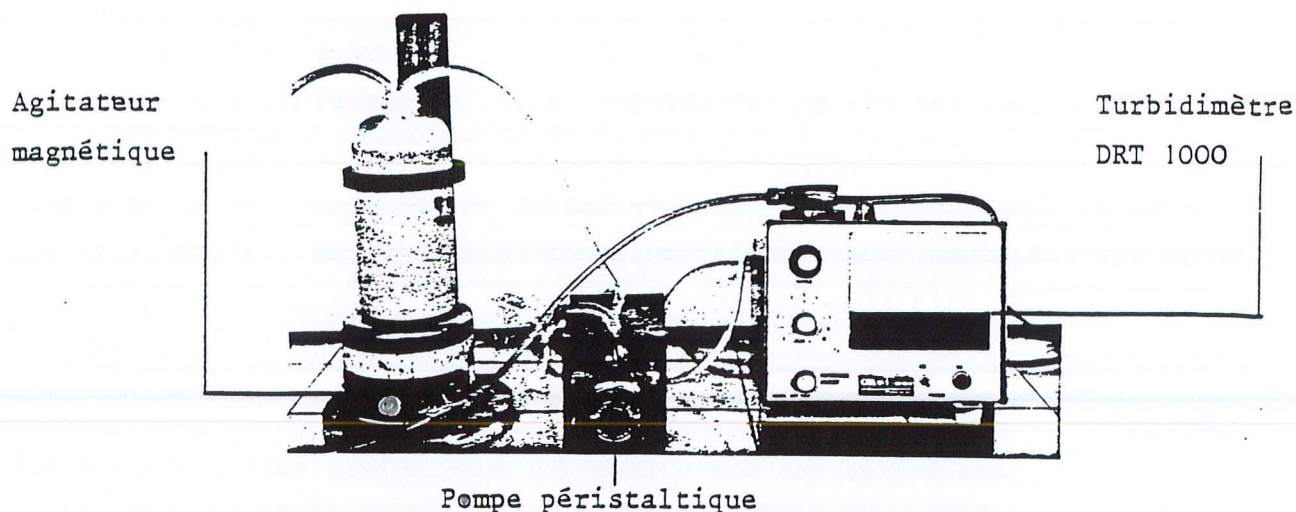


Figure 11 : Mesure de la turbidité.

contenant l'échantillon et la lumière diffractée à 90° est reçue sur un photomultiplicateur qui la convertit en signal électrique. Un étalonnage de l'appareil, à l'aide de solutions de sulfate d'hydrazine et d'hexaméthylène tétramine, permet d'exprimer cette turbidité en unité Formazine ou N.T.U. (Néphéломétric Turbidity Unit) (Fig.12).

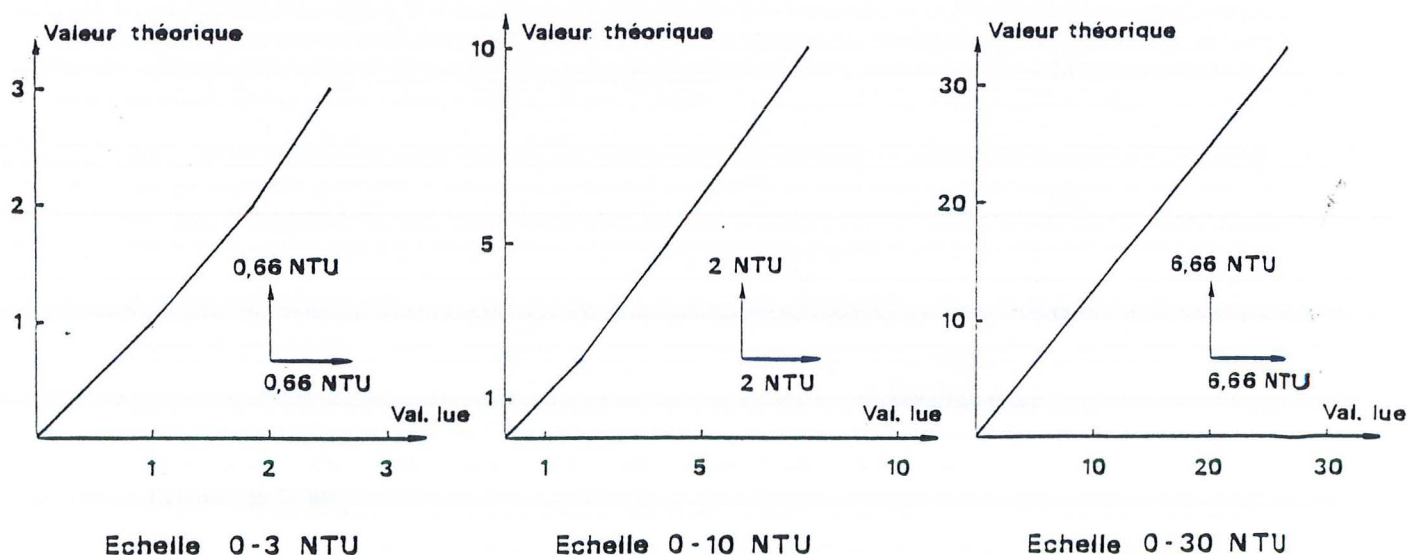


Figure 12 : Echelles de correction du turbidimètre par rapport à l'eau ULTRA-PURE (système Milli Q) le 25.10.82.

Les mesures sont en général effectuées sur des échantillons ramenés au laboratoire. Mais le turbidimètre DRT 1000 possède une cellule à flux continu : on peut ainsi éviter la décantation rapide de l'échantillon dans la cuve de mesure en réalisant, au moyen d'une pompe péristaltique, une circulation en circuit fermé de l'échantillon lui-même placé sous agitation magnétique. Appareil de terrain, il permet également d'effectuer en continu sur le bateau des profils verticaux de turbidité.

- Remarques :
- pour une concentration donnée, l'effet optique d'une suspension croît avec les dimensions des particules, tant que les dimensions sont inférieures à $\lambda/2 \pi$, au delà l'effet optique décroît avec leurs dimensions.
 - la confrontation des techniques montre qu'il n'y a pas de formule simple permettant de relier la diffusion à la masse de matières en suspension généralisable et utilisable pour tous les cas possibles (fig.13).

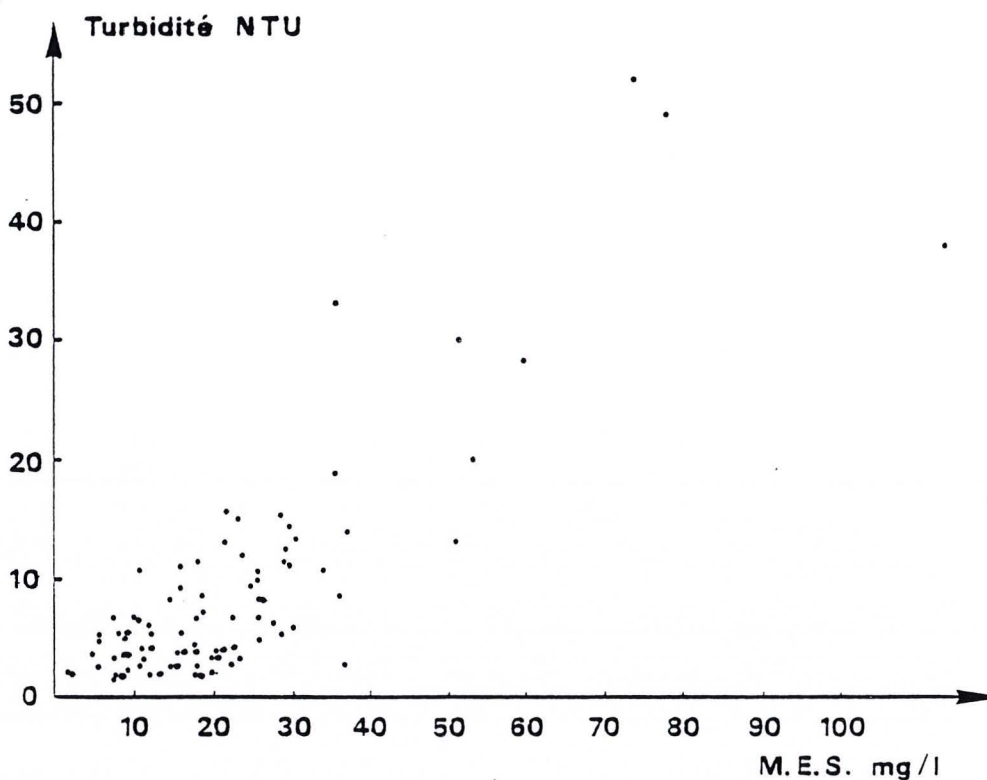


Fig.13 : Confrontation des mesures de turbidité
aux mesures de matières en suspension totales

III - 1.4. Matières en suspension totales

Elles sont séparées par filtration sur membranes GERMAN GA 6 (diamètre de pore 0,45 μ) prépesées. La quantité d'eau filtrée est en général un litre mais est parfois limitée à 1/2 litre en cas de colmatage des filtres, lors de la présence abondante de Phéocystis par exemple. Le colmatage du filtre n'étant pas forcément indicateur d'une masse importante de matières en suspension cette réduction du volume filtré doit être évitée au maximum et limitée au 1/2 litre afin de conserver une précision suffisante.

Après filtration sous pression contrôlée, colonne et filtre sont rincés avec une solution isotonique de formiate d'ammonium pour éliminer le sel. L'usage du formiate est préférable à celui de l'eau distillée afin d'éviter la destruction du plancton (BANSE, FALLS et HOBSON, 1963) et offre l'avantage, grâce à son caractère volatil, d'une élimination complète après passage à l'étuve.

En attendant le retour au laboratoire les filtres sont conservés au froid et à l'obscurité ; ils sont ensuite desséchés à l'étuve à $105^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ en même temps qu'une série de filtres vierges, et sont pesés le lendemain, après refroidissement en dessiccateur, sur balance SARTORIUS permettant d'apprécier le 1/100^e de milligramme.

Le taux de matières en suspension, exprimé en milligrammes par litre, est donné par l'expression :

$$\frac{(M_1 - M_0) 1000}{V}$$

V

M_0 = masse en mg de la membrane avant utilisation,

M_1 = masse en mg de la membrane après utilisation,

V = volume en millilitres d'échantillon filtré.

Les filtres témoins permettent d'apprécier par un calcul de pourcentage moyen la perte de masse de chaque filtre à la température considérée et d'effectuer ainsi une correction sur M_0 . La précision ainsi obtenue peut être estimée de l'ordre de 10^{-1} mg.

III - 1.5. Salinité

Les salinités sont déterminées à la Station Marine de Wimereux au moyen d'un salinomètre de laboratoire BECKMAN, modèle RS 7 C, salinomètre à induction (fig. 14). A l'aide de cet appareil la salinité est déterminée par la mesure du rapport de conductivité des échantillons à celle de l'eau de mer normale, les deux eaux étant ramenées à la même température par des corrections appropriées tenant compte d'éventuelles variations

de températures entre l'étalonnage du salinomètre et la mesure sur l'échantillon.

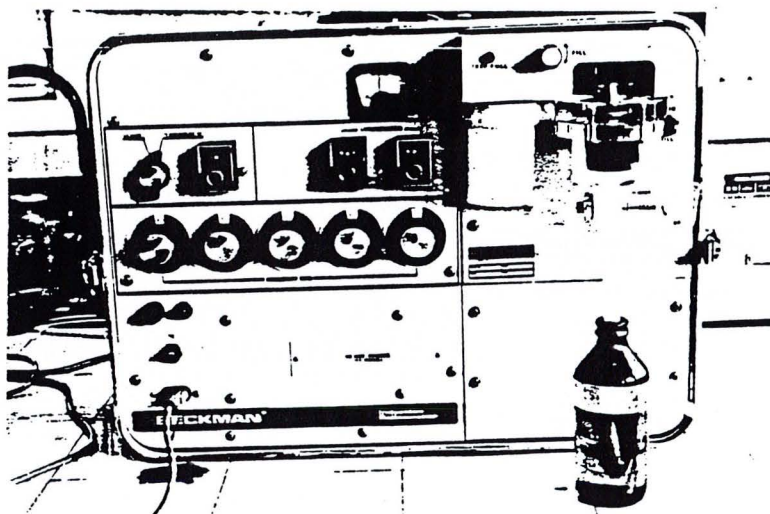


Figure 14 : Vue du salinomètre
BECKMAN RS 7 C.

Jusqu'au 1er janvier l'équation utilisée a été celle recommandée par WOOSTER *et al.* (1969) :

$$S \text{ ‰} = - 0,08996 + 28,29720 R_{15} + 12,80832 R_{15}^2 - 10,67869 R_{15}^3 \\ + 5,98624 R_{15}^4 - 1,32311 R_{15}^5$$

où R_{15} est le rapport entre la conductivité de l'eau de mer analysée et celle d'une Eau de Mer Normale à 35 ‰ de salinité, les deux échantillons étant à 15° C et sous une pression de 1 bar. A une température t ° C le rapport est R_t et on obtient R_{15} d'après $R_{15} = R_t + \Delta R$ avec

$$\Delta R = 10^{-5} R_t (R_t - 1) (t - 15) [96,7 - 72,0 R_t + 37,3 R_t^2 - (0,63 + 0,21 R_t^2)(t - 15)]$$

Depuis le 1er janvier 1982, selon les recommandations de l'UNESCO (1981) la nouvelle équation établie d'après la nouvelle échelle de salinité relative à la conductivité (Echelle pratique de salinité 1978) est utilisée. Dans cette EPS 1978, on définit ainsi : la salinité absolue, symbole SA, comme étant le rapport de la masse de substances dissoutes dans un certain volume d'eau de mer sur la masse totale de ce même volume d'eau de mer. Cette valeur ne pouvant être mesurée directement, une salinité pratique, symbole S, est définie à partir du rapport K_{15} de la conductivité électrique de l'eau de mer par rapport à celle du nouvel étalon absolu de conductivité qui est désormais une solution de KCl à 32,4356 g.Kg⁻¹ de solution en remplacement de l'Eau de Mer

Normale à 35 ‰. Cette dernière reste l'étalon secondaire utilisé pour calibrer les méthodes.

La relation liant salinité pratique S et rapport de conductivité R_t à la température $t^\circ\text{C}$, sous une pression d'une atmosphère normale est :

$$S = a_0 + a_1 R_t^{1/2} + a_2 R_t + a_3 R_t^{3/2} + a_4 R_t^2 + a_5 R_t^{5/2} + \frac{(t - 15)}{1 + R(t - 15)} + (b_0 + b_1 R_t^{1/2} + b_2 R_t^2 + b_3 R_t^{3/2} + b_4 R_t^4 + b_5 R_t^{5/2}) \Delta S$$

avec : $a_0 = 0,0080$	$b_0 = 0,0005$	$k = 0,0162$
$a_1 = -0,1692$	$b_1 = -0,0056$	$\Sigma a_i = 35,0000$
$a_2 = 25,3851$	$b_2 = -0,0066$	$\Sigma b_i = 0,0000$
$a_3 = 14,0941$	$b_3 = -0,0375$	
$a_4 = -7,0261$	$b_4 = 0,0636$	
$a_5 = 2,7081$	$b_5 = -0,0144$	

REmarques * - la relation est applicable dans la gamme de salinité de 2 à 42 ‰.
 - salinité et chlorinité deviennent des variables indépendantes
 - les différences exprimées en ‰ à 20°C entre les relations de 1978 et 1969 sont pour $S = 35 : 0,000$
 $S = 30 : 0,004$

(LEWIS et PERKIN, 1981).

Les eaux étudiées ayant en général une salinité $S > 33$, cette différence ne devrait pas excéder 0,002 alors que la précision de l'appareil lui-même n'excède pas 0,005 ‰ dans les meilleures conditions d'utilisation.

III - 1.6. Mesure électrochimique du pH (Fig. 15)

Elle se fait le plus rapidement possible après le prélèvement. Dans le cas d'une mesure différée (retour au laboratoire), les précautions de conservation étant respectées, on ne devrait pas constater de variations significatives dans les 5 à 6 heures suivant le prélèvement (SMITH et HOOD, 1964 ; in Manuel des méthodes de prélèvements et d'analyses, RNO, 1977).

Les mesures sont effectuées à bord, au moyen d'un pHmètre de terrain à aiguille, Radiometer modèle 29, gradué en dixième

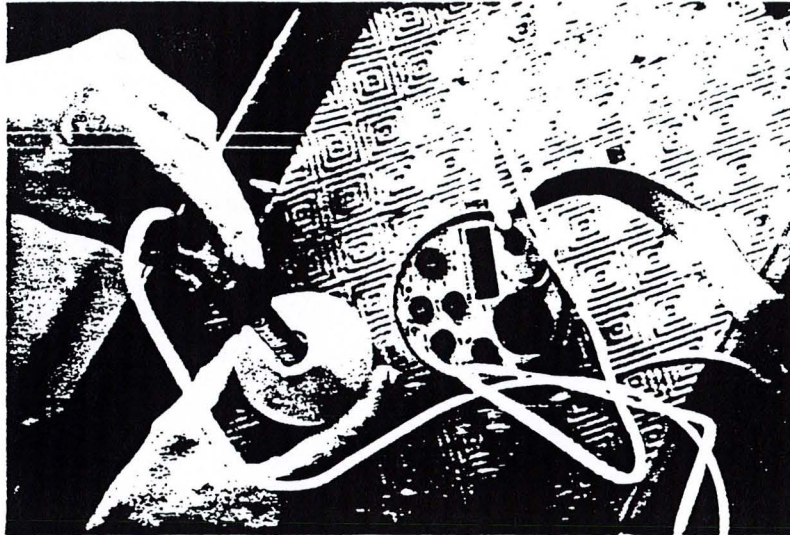


Figure 15 : Mesure électrochimique du pH



Figure 16 : Dosage de l'oxygène dissous :
addition des réactifs à l'aide
de pipettes automatiques.

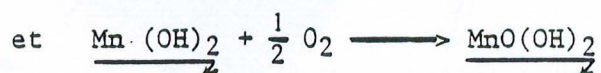
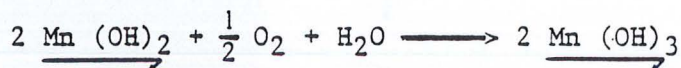
d'unité pH ou d'un pHmètre Metrohm Herisan, modèle E 603, affichant le centième d'unité pH, lorsque les mesures sont faites de retour au laboratoire. A partir de fin 1983, un pHmètre de terrain à affichage numérique direct permettant une lecture non affectée par les vibrations et les mouvements du bateau est utilisé : pHmètre digital Knick modèle 651.

III - 1.7. Oxygène dissous (Fig. 16 et 17)

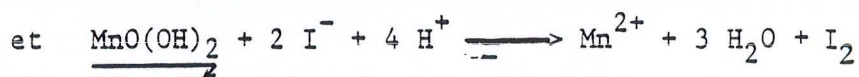
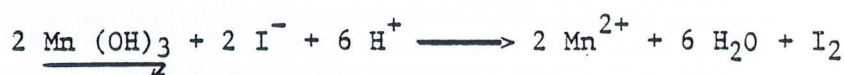
Le dosage est fait suivant la très classique méthode de WINKLER : on ajoute successivement dans l'échantillon d'eau de mer, une solution de MnII, puis une base forte :



le précipité formé est dispersé dans l'échantillon et l'oxygène dissous fait alors passer le manganèse à des degrés d'oxydation supérieurs (III ou IV) :



la solution est ensuite acidifiée en présence d'iodure. Il y a formation d'iode avec retour du manganèse au degré d'oxydation II (redissolution du précipité) :



L'iode libérée est dosée par le thiosulfate :



Les deux premiers réactifs (Mn^{2+} et base forte) sont additionnés à l'eau de mer, immédiatement après le prélèvement ou tout au moins dans la demi-heure suivante. Cette addition est faite juste au-dessous de la surface de l'échantillon, au moyen de pipettes automatiques (Fig. 16). On bouche rapidement sans emprisonner de bulle d'air et on agite vigoureusement pour disperser le précipité formé.



Figure 17 : Dosage de l'oxygène dissous au moyen
d'une burette à piston motorisé,
DOSIMAT E 535.

Les échantillons ainsi traités sont alors placés à l'abri de la lumière puis complètement immergés dans l'eau de mer aussitôt le retour au laboratoire afin d'éviter le dessèchement du rodage et en évitant également toute contraction thermique.

L'acidification et le dosage proprement dits ont lieu au laboratoire dans le mois suivant le prélèvement. Le titrage est effectué sur des prises d'essais de 50 ml au moyen d'une burette à piston motorisé DOSIMAT E 535 (METHROM HERISAU). L'utilisation d'un titreur à point de fin de réaction couplé à ce DOSIMAT devrait permettre par un dosage potentiométrique automatisé, d'obtenir une plus grande reproductibilité (Fig. 18).

Les trois échantillons prélevés sont ainsi analysés. Les résultats sont exprimés en Ml/l, et l'écart type obtenu rapport à la moyenne sur les trois mesures dépasse rarement 5.10^{-2} ml/l.

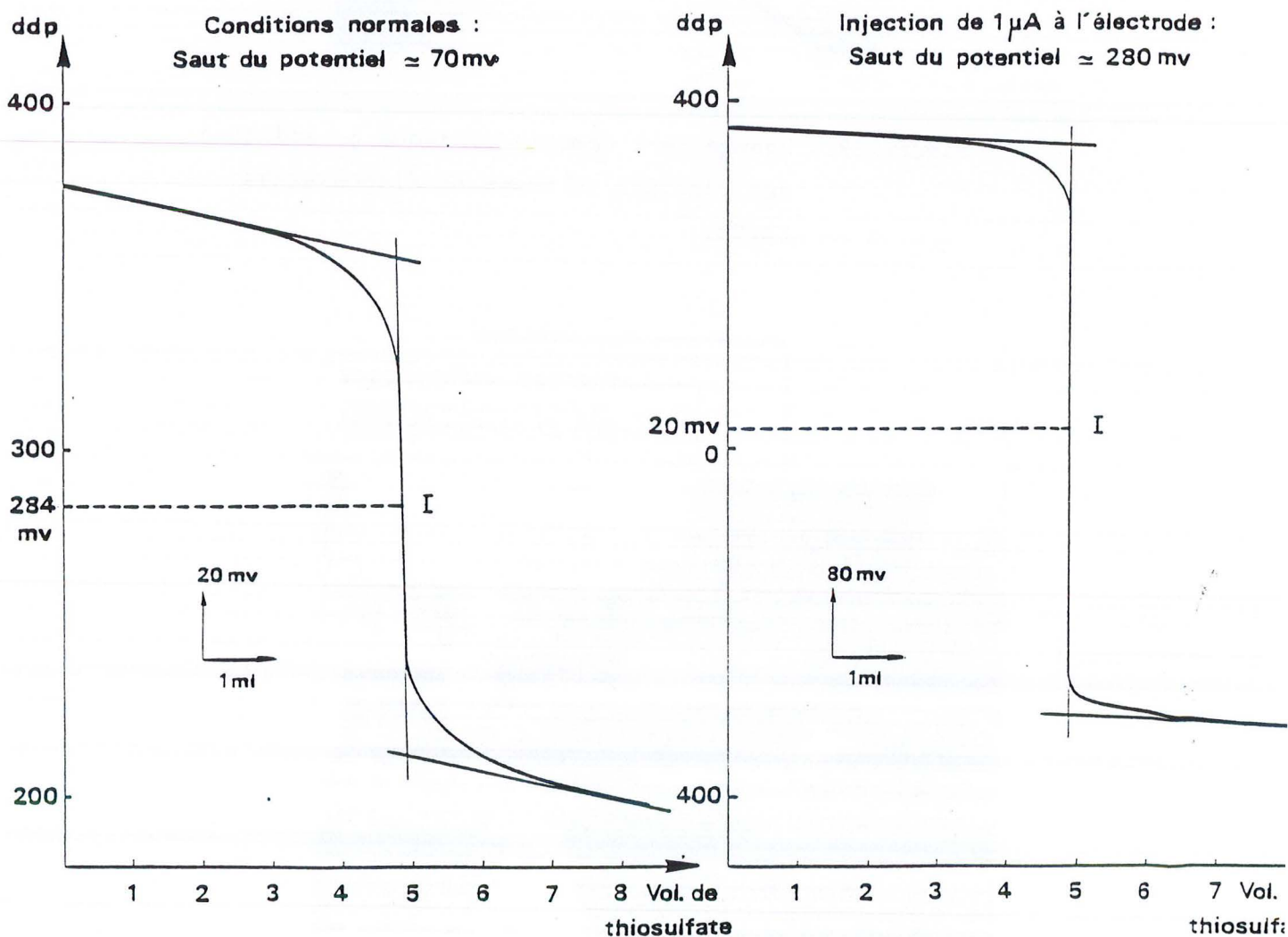


Figure 18 : Dosage de l'oxygène par potentiométrie : Détermination du point de fin de réaction (amélioration de la sensibilité par polarisation de l'électrode).



Figure 19 : Dosage de l'ammoniac dissous ; addition des réactifs au moyen de dispensettes BRAND.

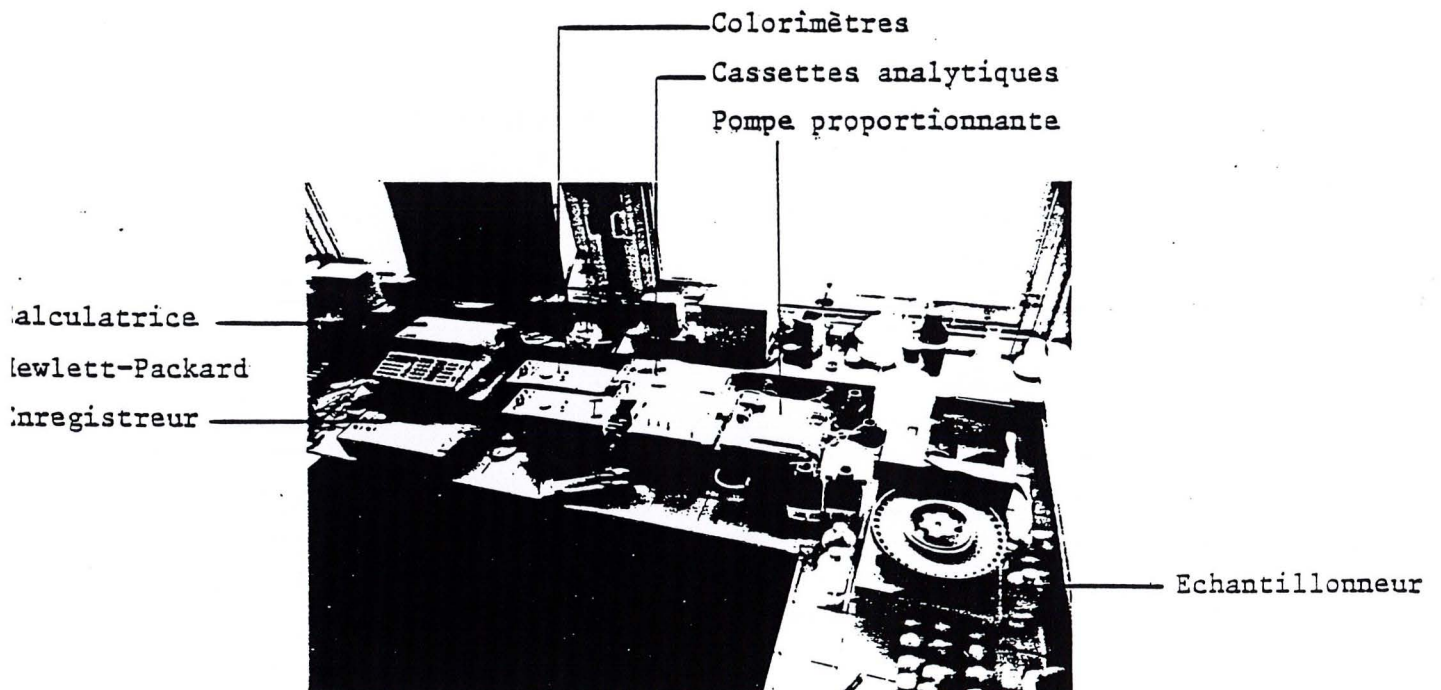


Figure 20 : Autoanalyseur Technicon

III - 1.8. Sels nutritifs dissous

III - 1.8.1. Dosage des ions ammonium (azote ammoniacal)

Le dosage est basé sur la réaction signalée par BERTHELOT en 1859. En milieu alcalin ($8 < \text{pH} < 11,5$), l'ammoniac dissous réagit sur l'hypochlorite pour former une monochloramine. Ce composé, en présence de phénol et en milieu oxydant (excès d'hypochlorite), donne lieu à la formation d'un bleu d'indophénol absorbant à 630 nm. La réaction, catalysée par l'ion nitroprussiate, demande 6 heures pour se développer à 20°C.

La technique de dosage est celle appliquée à l'eau de mer par KOROLEFF et SOLORZANO en 1969 selon les recommandations du R.N.O.

Les réactifs sont ajoutés immédiatement après le prélèvement au moyen de dispensettes BRAND. Après chaque addition de réactif, le flacon est soigneusement agité puis fermé hermétiquement. Il est ensuite maintenu à l'obscurité à température ambiante. On laisse la réaction se poursuivre plusieurs jours.

Les mesures sont effectuées le lendemain dans la cuve (de 5 cm de trajet optique) d'un spectrophotomètre double faisceau (BECKMAN UV 24). Il permet dans le cas de turbidités négligeables et après étalonnage, de sortir les résultats directement en concentrations dans l'unité choisie.

III - 1.8.2. Autres sels nutritifs

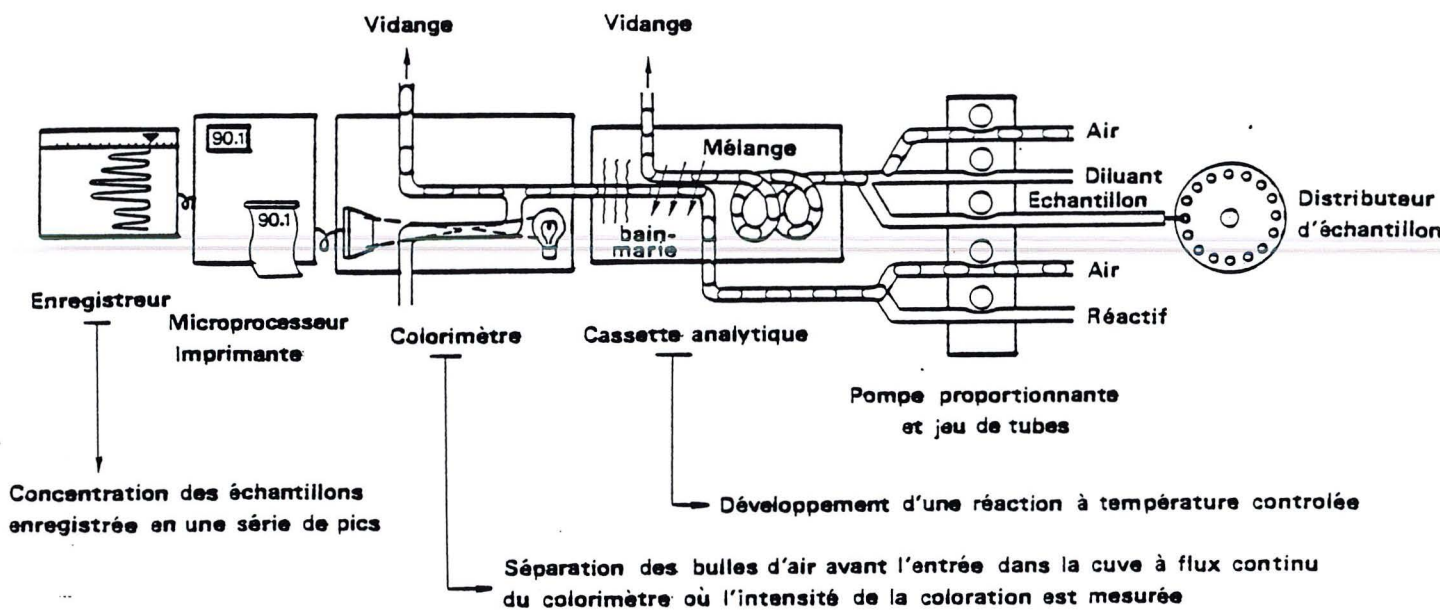
L'analyse a lieu aussitôt après décongélation, au moyen d'une chaîne AUTOANALYZER II TECHNICON (Fig. 21).



Figure 21 : Vue d'ensemble de l'autoanalyseur II Technicon :

L'autoanalyseur Technicon permet d'automatiser les méthodes spectrophotométriques d'analyse des sels nutritifs. Cette automatisation est basée sur le principe du "flux continu". Les fluides circulent en continu à travers le système analytique par pompage à l'aide de "pompes proportionnantes" (fig. 22).

Fig. 22 : CIRCULATION DES FLUIDES A L'INTERIEUR D'UNE CHAINE D'ANALYSE AUTOMATIQUE TECHNICON



Les échantillons sont introduits successivement par un distributeur. La contamination entre échantillons successifs, due à des phénomènes de diffusion est éliminée au moyen d'une segmentation des veines liquides par injection périodique d'air. Le mélange des réactifs et des échantillons est alors réalisé par effet de densité dans des bobines en verre. La présence de bains thermostatés permet dans certains cas d'accélérer la réaction.

A l'extrémité de la chaîne, une fois la réaction chimique terminée, le passage dans la cuve d'un colorimètre permet de suivre les variations de densité optique (D) par l'intermédiaire d'un enregistreur. la loi de Beer Lambert : $D = \epsilon \ell c$ (ϵ = coefficient d'extinction molaire ; ℓ = longueur de soluté traversé par la lumière monochromatique) permet alors après étalonnage préalable et pour un certain domaine de concentration, de calculer celle de l'échantillon (c) (fig. 23).

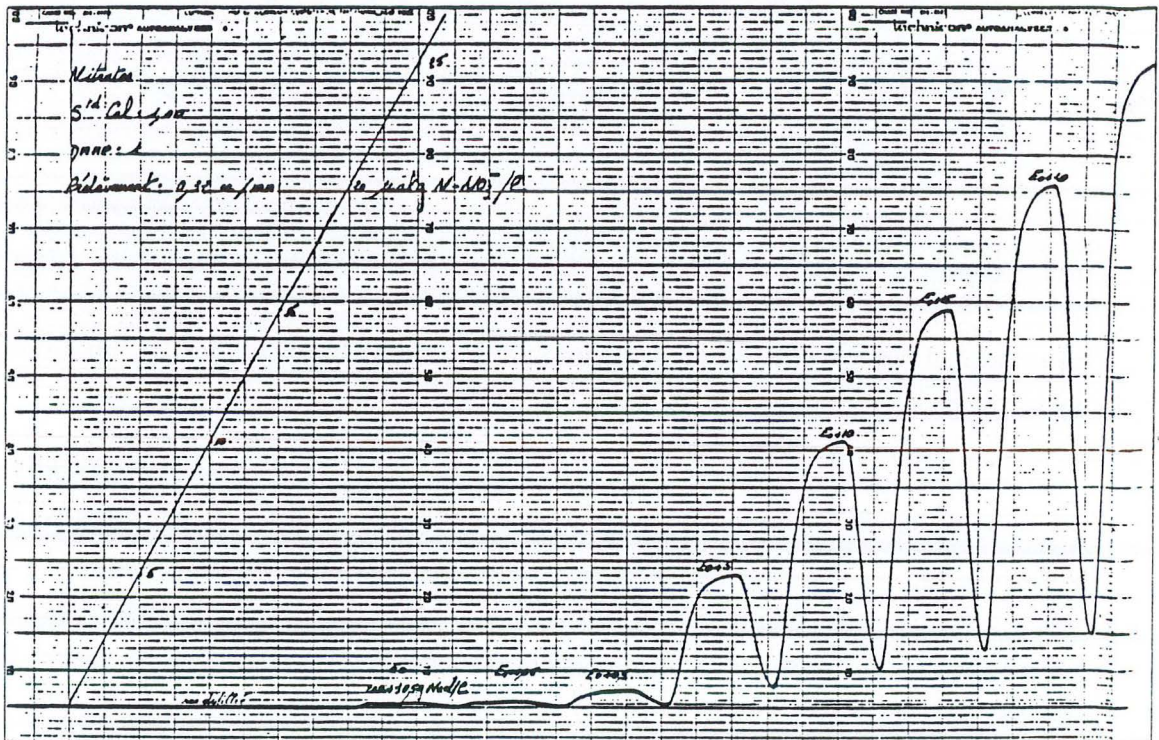
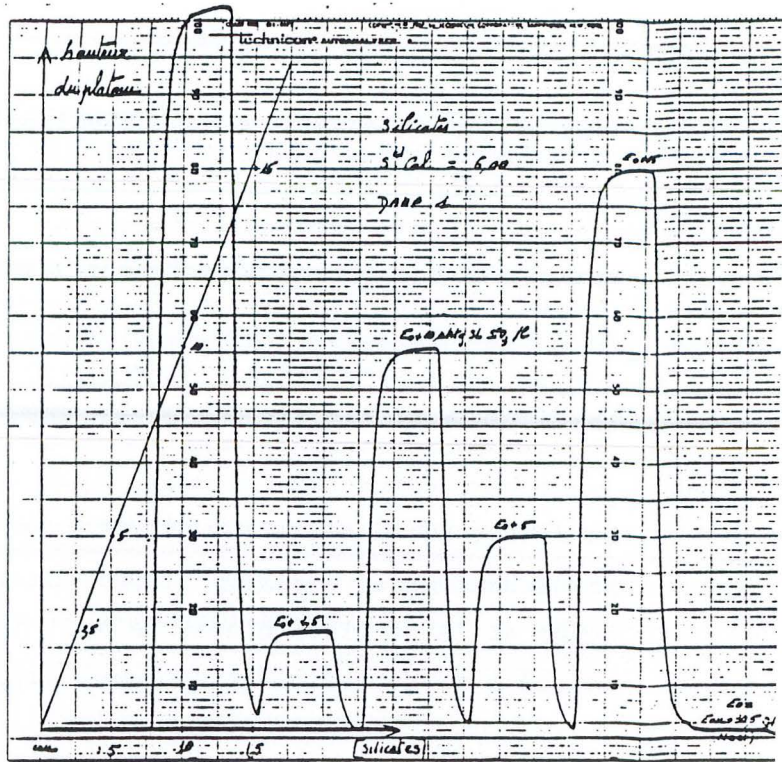
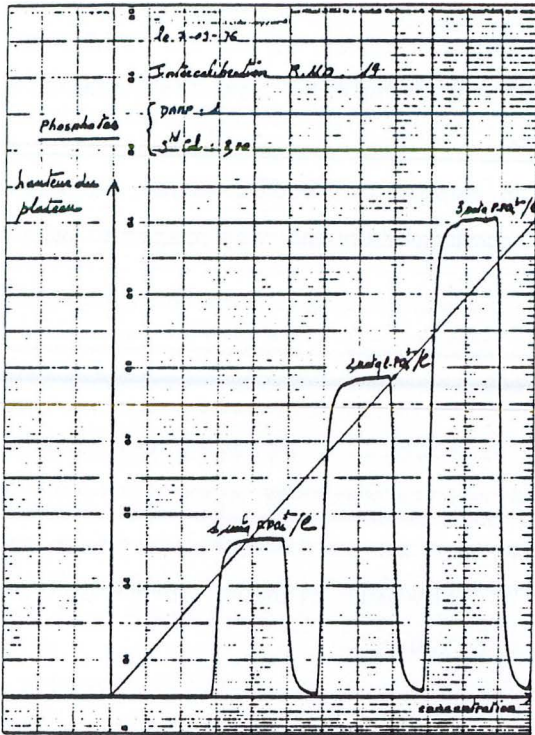


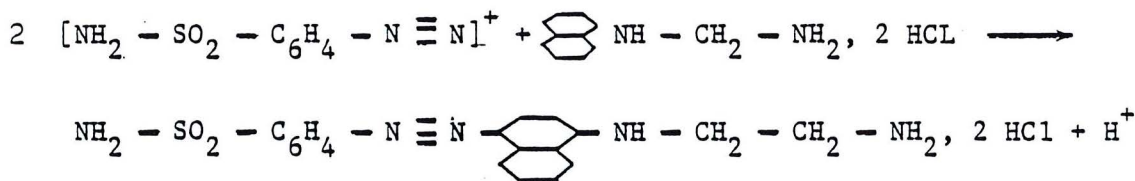
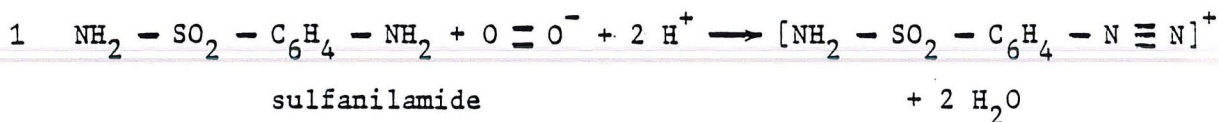
Fig. 23 : Enregistrements et courbes d'étalonnage obtenus pour quelques dosages effectués sur Autoanalyseur II TECHNICON

Depuis début 1982, les colorimètres sont également couplés à une calculatrice HEWLETT-PACKARD par l'intermédiaire d'une interface qui permet également la commande des échantillonneurs.

L'ensemble permet ainsi de sortir simultanément pour un même échantillon les concentrations des quatre sels nutritifs suivants : Nitrites, Nitrates, Phosphates et Silicates. Ces quatre dosages sont réalisés à l'aide des circuits analytiques et selon la méthodologie indiquée par TREGUER et LE CORRE (1974).

III-1.8.2.1. Dosages des nitrites

Le dosage automatique des nitrites est basé sur la méthode mise au point par BENDSCHNEIDER et ROBINSON (1952). La diazotation de la sulfanilamide en milieu acide et la copulation avec le N (1 naphtyl) éthylène diamine donne un complexe coloré pourpre (colorant azoïque) absorbant à 540 nm.



III-1.8.2.2. Dosages des nitrates

Ils sont dosés par la méthode décrite précédemment après leur réduction quantitative en nitrites par passage à travers une colonne Cadmium-Cuivre. La concentration en nitrates est obtenue après soustraction de la concentration réelle en nitrites.

III-1.8.2.3. Dosage des phosphates

En milieu acide (pH < 1) et en présence de molybdate d'ammonium, les orthophosphates donnent un hétéropolyanion ou complexe phosphomolybdique qui, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue absorbant à 885 nm. La réaction de réduction est catalysée par l'émétique ou antimonyl oxytartrate de potassium.

III-1.8.2.4. Dosage du silicium dissous

La majorité du silicium dissous se trouve sous la forme d'acide orthosilicique $\text{Si}(\text{OH})_4$, dont 5 % seraient ionisés $[\text{SiO}(\text{OH})_3]^-$ au pH habituel de l'eau de mer. Le dosage est basé sur la méthode décrite par MULLIN et RILEY (1955). Les sili-

cates solubles réagissent en milieu acide ($1 < \text{pH} < 2$) avec le molybdate d'ammonium pour former un hétéropolyacide : l'acide silicomolybdique, complexe jaune qui donne après réduction un bleu de molybdène mesurable à 660 nm.

III - 1.8.3. Remarques sur la précision et la signification des dosages des éléments nutritifs dissous

° Ammoniac dissous °

Les essais effectués le 10.11.79

montrent qu'il convient de nuancer les discussions sur les valeurs d' N/NH_4^+ en tenant compte :

- des écarts de mesure existant à l'intérieur d'un même échantillon (écart pouvant atteindre $0,5 \mu\text{atg}$ au niveau de $10 \mu\text{atg N-NH}_4^+/1$).
- des contaminations extérieures possibles, à titre indicatif pour les prélèvements effectués sur la digue de Dunkerque, l'écart peut atteindre $1 \mu\text{atg}$ au niveau de $6 \mu\text{atg N-NH}_4^+/1$.
- de la grande variation dans le temps des teneurs en NH_4^+ des eaux côtières, indépendamment des sources de contamination. L'écart entre deux échantillons réalisés à 1/4 d'heure d'intervalle peut atteindre $2 \mu\text{atg}$ pour des eaux d'une concentration d'environ $10 \mu\text{atg N-NH}_4^+/1$ (essais digue de Wimereux du 4.11.76). Ils montrent en outre que l'erreur due strictement à la méthodologie du dosage est négligeable par rapport à toutes les autres sources d'erreur (précision $< 5\%$ au niveau de $5 \mu\text{atg N-NH}_4^+/1$).

° Nitrites, Nitrates, Silicates et Phosphates °

Il est à remarquer que :

- si la filtration sur $0,45 \mu$ entraîne une manipulation supplémentaire, elle nous apparaît indispensable à cause de la turbidité importante des eaux à analyser, ceci afin d'améliorer la conservation des échantillons. Toutes précautions sont évidemment prises lors de la manipulation du matériel de filtration afin d'éviter toute contamination de l'échantillon.
- La conservation des échantillons dans des flacons de 60 ml plutôt que dans des flacons de plus grande capacité qui auraient diminué les effets de parois, a permis un meilleur refroidissement puis une congélation plus rapide de ces échantillons (encombrement moindre permettant le stockage dans un congélateur portatif sur le bateau ainsi que pendant le retour au laboratoire).
- L'addition de chloroforme qui était l'élément le plus sujet à caution a été abandonnée. En effet, si elle paraît reconnue utile dans le cas d'une congéla-

tion différée pour le dosage des phosphates, elle semble avant tout être source de contaminations pour le dosage des autres sels nutritifs. Des vérifications nous avaient permis de constater qu'elle provoquait surtout une modification de la turbidité lors des différents dosages, et l'utilisation du microprocesseur pour traiter les valeurs est incompatible avec des signaux perturbés et des turbidités fluctuantes.

Des essais effectués à Boulogne nous ont montré que les écarts de mesure existant entre des sous-échantillons provenant du même échantillonnage n'excèdent pas la précision de la mesure en ce qui concerne les nitrates et les silicates ($< 0,1 \mu\text{atg/l}$), lui sont légèrement supérieurs pour les nitrites ($3 \cdot 10^{-2}$ au lieu de $1 \cdot 10^{-2} \mu\text{atg N-NO}_2^-$) mais plus nettement supérieurs pour les phosphates ($5 \cdot 10^{-2}$ au lieu de $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{atg P-PO}_4^{3-}/\text{l}$).

III - 2. Paramètres biologiques

III - 2.1. Les pigments chlorophylliens

Constituants cellulaires caractéristiques des végétaux, leur dosage représente la méthode de mesure de la biomasse phytoplanctonique la plus utilisée. Ce dosage peut également permettre de traduire l'état physiologique d'une communauté phytoplanctonique ou servir à l'estimation de la production primaire.

III - 2.1.1. Précautions particulières

La structure chimique des chlorophylles peut être altérée par divers processus biologiques et physicochimiques conduisant à des dérivés photosynthétiquement inactifs. Afin de limiter

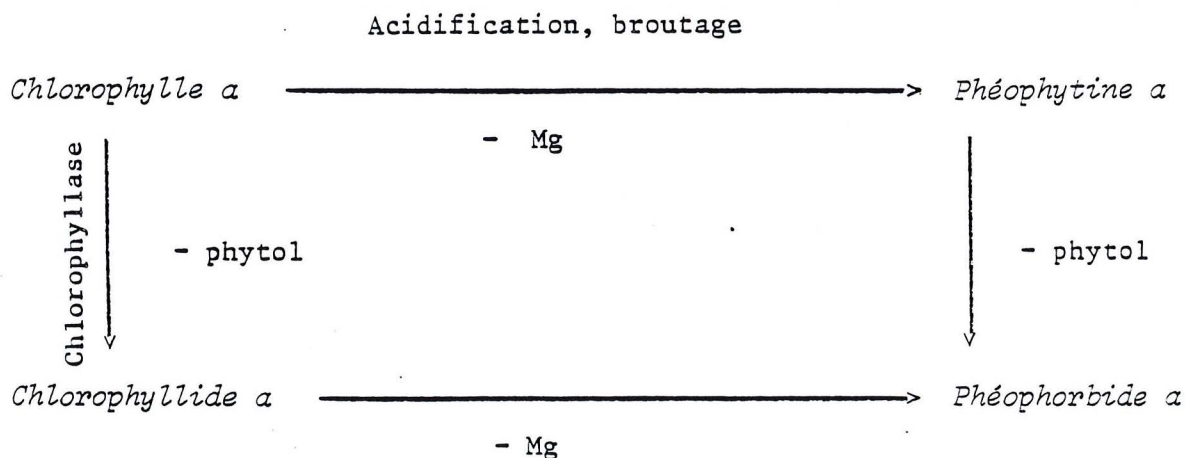




Figure 24 : Analyse de chlorophylle. Dépôt de Carbonate de magnésium sur filtre Whatman avant filtration.

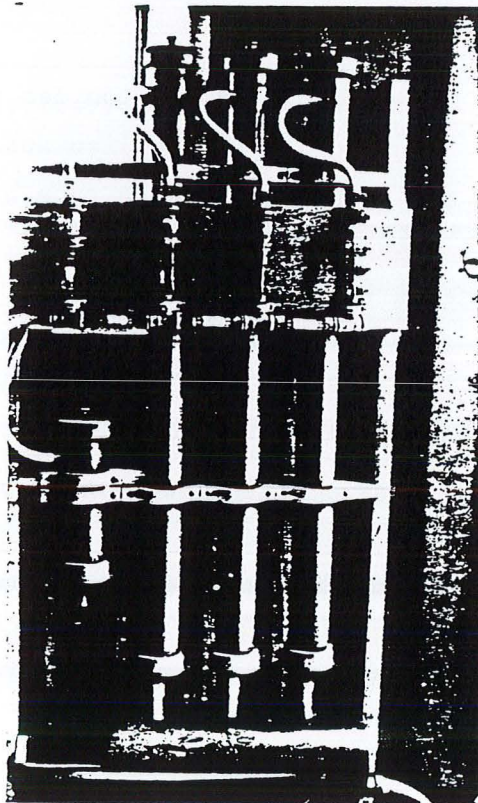


Figure 25 : Analyse de chlorophylle. Système de filtration sous pression permettant de conserver les échantillons à l'abri de la lumière.

le plus possible cette dégradation après le prélèvement, on s'efforcera tout au long des différentes étapes de dosage d'éviter au maximum les éclaircissements forts, les températures élevées et les vapeurs d'acide.

III - 2.1.2. Filtration

On utilise des filtres en fibre de verre (WHATMAN GF/C de 47 mm de diamètre par exemple) chimiquement inertes vis-à-vis des solvants organiques.

La filtration s'effectue sous vide modéré (150 mm de Hg) ou pression contrôlée* afin de limiter le risque d'éclaircissement des cellules.

Lorsque la filtration est différée de quelques heures, l'addition d'une pincée de carbonate de magnésium dans l'échantillon, permet d'éviter une dégradation trop rapide de la chlorophylle. L'extraction étant différée au moins jusqu'au retour au laboratoire, l'ajout de carbonate est effectué systématiquement par dépôt d'un millilitre d'une suspension à 1 %, sur le filtre avant filtration (Fig. 24). En fin de filtration, on lais-
fluer l'air quelques instants afin de sécher le filtre, puis on enferme celui-ci, après l'avoir roulé, dans un tube à essais, entouré de papier aluminium, que l'on place ensuite au froid.

III - 2.1.3. Extraction des pigments

Elle a lieu aussitôt le retour au laboratoire, sinon, le filtre est conservé dans son tube bouché, au congélateur. Cependant, les résultats obtenus dans ce cas seront sous-estimés et le rapport chlorophylle/phaéopigments risque d'être modifié.

L'extraction se fait dans 5 ml d'acétone à 90 % obtenu à partir d'acétone desséché sur carbonate de sodium anhydre. Le filtre est déchiqueté à l'aide d'une baguette de verre à embout coupant afin de libérer les cellules emprisonnées dans les fibres. L'extraction est poursuivie au réfrigérateur durant un temps variable suivant les auteurs : une heure suffirait selon NEVEUX (1975) alors que 18 à 24 heures seraient nécessaires selon RICHARDS et THOMPSON (1952). Ce sont ces durées qui permettent de repousser les mesures au lendemain de la sortie en mer qui ont été adoptées.

* Les avantages du système de filtration sous pression sont qu'il peut être facilement utilisé par mauvais temps et qu'il permet de maintenir l'échantillon à l'obscurité pendant la durée de l'opération. (Fig. 25).

L'échantillon est ensuite centrifugé, afin d'éliminer la membrane filtrante, à 4 000 tours. mn^{-1} pendant 20 mn sur un appareil à rotor libre. On prend soin d'interrompre la centrifugation au bout d'une minute pour pouvoir faire retomber les fibres adhérentes à la paroi au-dessus de la surface du solvant en agitant légèrement le tube.

III - 2.1.4. Méthode spectrophotométrique du dosage de la chlorophylle a

Elle utilise les propriétés spectrales de l'extrait acétonique (dans l'acétone à 90 %) des pigments d'algue

Le spectre présente deux pics principaux dans le visible : l'un vers 430 nm correspond à l'absorption des chlorophylles et des caroténoïdes, l'autre vers 663 nm est dû à l'absorption des seules chlorophylles. (Fig.26).

Après extraction et centrifugation, on laisse le surnageant revenir à température ambiante. Il est ensuite transféré dans la cuve d'1 cm (ou 5 cm dans le cas de faibles concentrations) de trajet optique d'un spectrophotomètre BECKMAN UV 24 double faisceau. L'utilisation d'une cuve de faible volume, équipée d'un système de remplissage et de vidange automatiques permet un gain de temps appréciable et une plus grande fiabilité du zéro.

Les équations utilisées étant celles proposées en 1966 par un groupe de travail du SCOR/UNESCO, les densités optiques sont mesurées à 663, 645 et 630 nm. Une mesure à 750 nm permet de vérifier que la turbidité de l'échantillon n'excède pas 0,01 de D.O. (sinon, il faut centrifuger). En dessous de 0,01 à 750 nm, la valeur lue est soustraite des densités optiques obtenues aux autres longueurs d'onde.

Equation du SCOR/UNESCO (1966) (valable pour 1 cm de trajet optique)

$$\text{Ca (Mg/l)} = 11,64 D_{663} - 2,16 D_{645} + 0,10 D_{630}$$

Pour déterminer les concentrations par unité de volume d'eau de mer, on utilise la formule suivante :

$$\text{Chl a (Mg/m}^3 \text{ ou } \mu\text{g/l)} = \frac{\text{Ca} \cdot \text{v}}{\text{V} \cdot 1000}$$

Ca = concentration de l'extrait acétonique

v = volume de l'extrait en ml

V = volume d'eau de mer filtrée en litre

D_λ = densité optique à la longueur d'onde λ , déduction faite de la densité optique mesurée à 750 nm

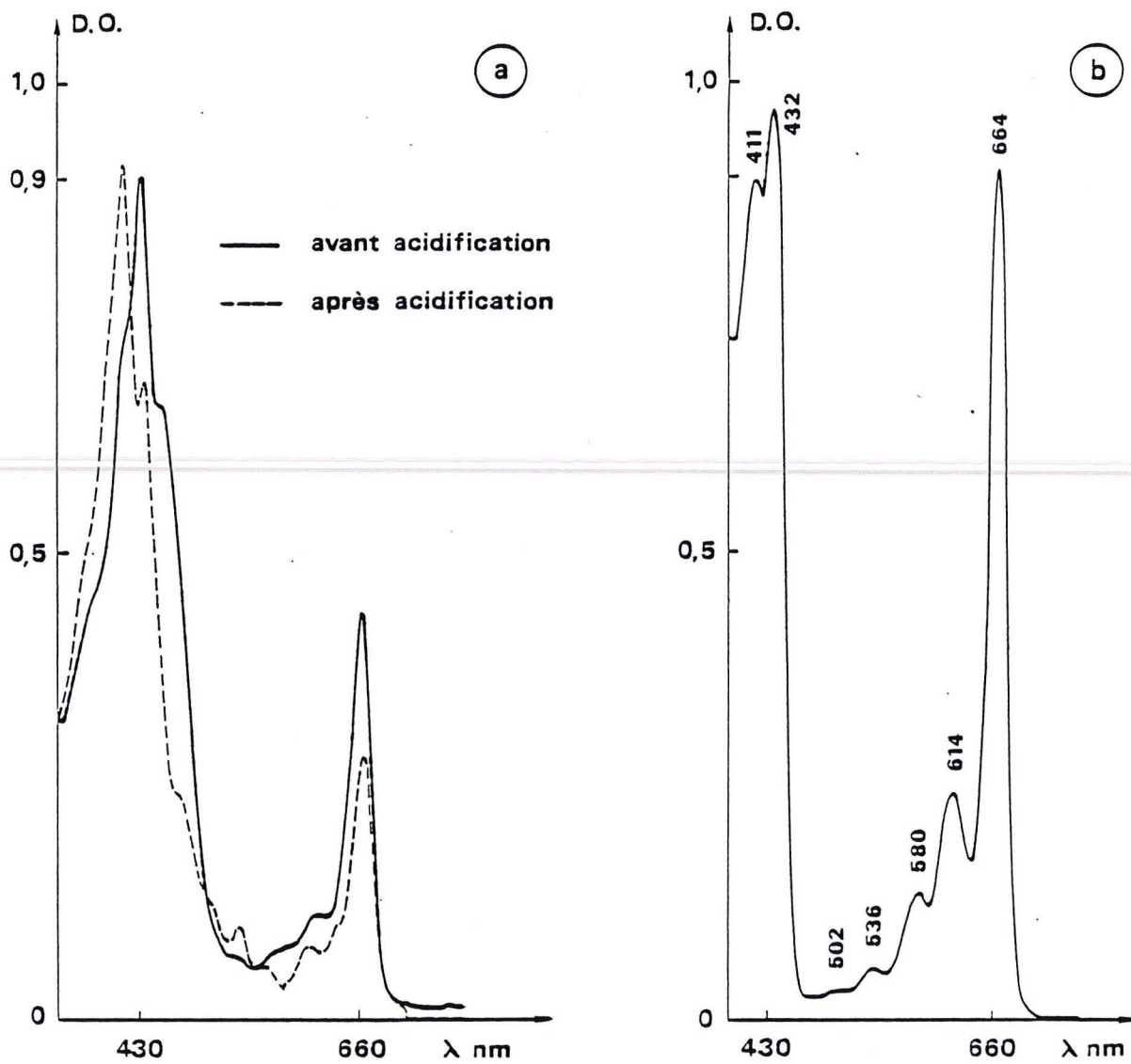


Fig.26 : Spectres d'absorption, dans l'acétone à 90 %

- (a) d'un extrait de phytoplancton
- (b) de chlorophylle a purifiée

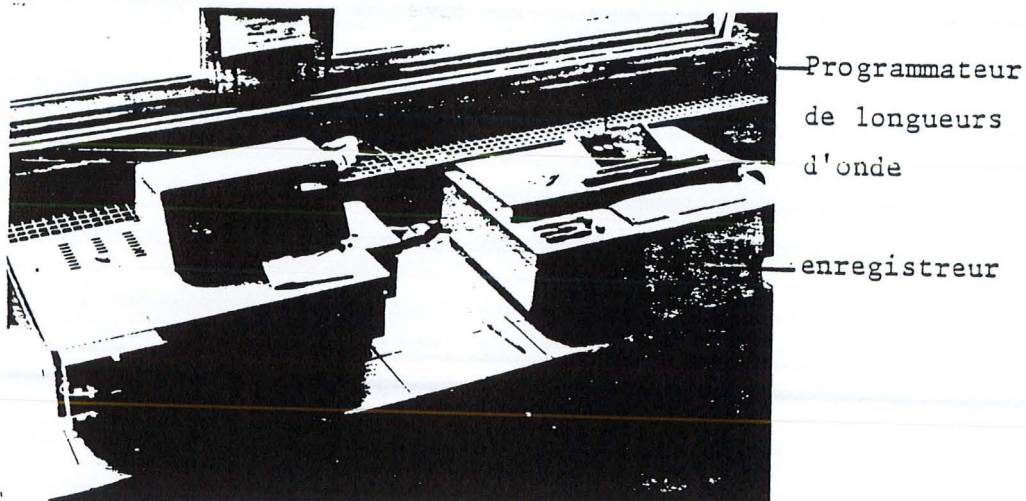


Figure 27 : Spectrophotomètre BECKMAN UV 24.

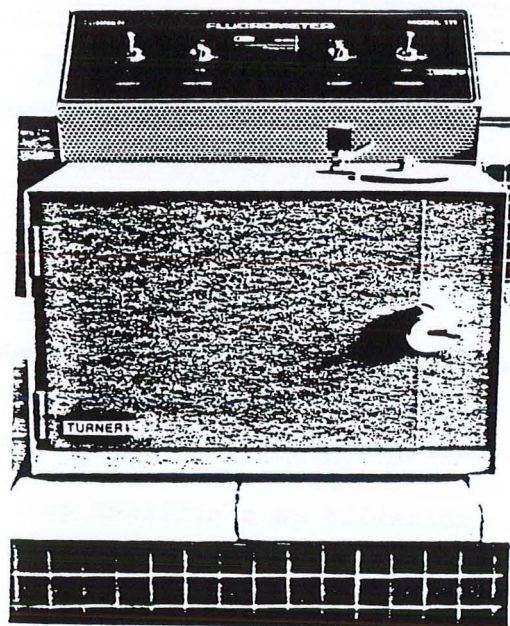


Figure 28 : Fluorimètre TURNER Modèle 111.

Dans le cas de l'utilisation d'une cuve de 5 cm de trajet optique, les résultats obtenus sont divisés par 5.

III - 2.1.5. Méthode fluorimétrique

Elle est basée sur le fait que les chlorophylles et leurs dérivés fluorescent dans le rouge lorsqu'ils sont excités par de la lumière bleue ou ultra violette.

La mesure de cette fluorescence *in vivo* (LORENZEN, 1966) permet le dosage direct de la chlorophylle en utilisant un fluorimètre à flux continu. Les enregistrements sont calibrés par détermination de la concentration en chlorophylle a, après extraction et dosage spectrophotométriques de quelques échantillons. Cette fluorescence *in vivo* est surtout utilisée pour obtenir des profils verticaux continus et n'a qu'une utilisation limitée comme mesure de biomasse, vue la grande variabilité observée dans les rapports fluorescence *in vivo*/chlorophylle a (KIEFER, 1973).

C'est la variation de fluorescence d'un extrait de pigment, après acidification, qui permet après étalonnage du fluorimètre, de déterminer la concentration de l'extrait en chlorophylle a. C'est une méthode rapide, pratique et sensible. On y a donc recours dans les mesures de routine ou lorsque les D.O. des extraits acétoniques sont inférieures à 0,05. Elle nécessite cependant un étalonnage préalable de l'appareil (fluorimètre TURNER 111 avec équipement chlorophylle) à l'aide de solutions de chlorophylle a, dont les concentrations ont été déterminées au spectrophotomètre. Cet étalonnage doit être fait tous les 2 mois et après chaque changement d'un élément du fluorimètre : PM, lampe, filtre, etc...

Pratiquement on mesure la fluorescence F_0 des extraits acétoniques obtenus après acidification, après avoir réglé le zéro de l'appareil avec un tube témoin ayant subi les mêmes traitements que les échantillons mise à part la filtration du plancton. On ajoute 2 gouttes d'HCl 1 N, on attend une minute, puis on lit à nouveau la fluorescence F_a . Il est conseillé de n'utiliser qu'un seul tube pour chacun des échantillons, de l'extraction jusqu'à la lecture de fluorescence incluse. Ce tube en verre, bouché hermétiquement doit donc pouvoir supporter la centrifugation et se placer dans le porte-échantillon du fluorimètre. Les concentrations en chlorophylle a et phéophytine a sont données par les équations de LORENZEN (1966).

$$\text{Chlorophylle a (mg/m}^3\text{)} = K_x \cdot \frac{F_o}{F_a} \text{ max. } F_a \cdot \frac{\frac{F_o}{F_a} - 1}{\frac{F_o}{F_a} \text{ max} - 1} \times \frac{v}{1000 \cdot V}$$

$$\text{Phéophytine a (mg/m}^3\text{)} = K_x \cdot \frac{F_o}{F_a} \text{ max. } F_a \cdot \left(1 - \frac{\frac{F_o}{F_a} - 1}{\frac{F_o}{F_a} \text{ max} - 1} \right) \times \frac{v}{1000 \cdot V} \cdot 0,975^*$$

* Rapport des poids moléculaires Phéophytine a/Chlorophylle a (inutile si l'on considère non pas le poids réel de phéophytine mais une équivalence en chlorophylle a dégradée).

$\frac{F_o}{F_a} \text{ max}$ = rapport d'acidification de la chlorophylle a pour l'appareillage donné.

F_o = fluorescence de l'échantillon avant acidification.

F_a = fluorescence de l'échantillon après acidification.

v = volume de l'extrait acétonique (en ml).

V = volume d'eau de mer filtrée (en litres)/

K_x = constante de calibration pour une fente donnée du fluorimètre.

III - 2.1.6. Détermination de la concentration en phéopigment

Elle est réalisée à partir du même extrait que celui utilisé pour la détermination de la quantité en chlorophylle.

L'acidification de cet extrait par un acide fort dilué (HCl, 1 N) transforme les chlorophylles en phéophytines par élimination de leur atome de magnésium central. Cette transformation provoque une modification du spectre d'absorption (déplacement du maximum bleu vers l'ultra violet et diminution d'absorption à 665 nm, fig. 26), ainsi qu'une variation de fluorescence

Les équations utilisées sont celles

de LORENZEN :

- méthode fluorimétrique LORENZEN, 1966 (cf. paragraphe III - 2.1.5.),
- méthode spectrophotométrique : LORENZEN, 1967 :

$$\text{Chlorophylle a (mg.m}^{-3}\text{)} = \frac{A \cdot k (D 665_0 - D 665_a) \cdot v}{V \cdot L \cdot 1000}$$

$$\text{Phéophytine a (mg.m}^{-3}\text{)} = \frac{A \cdot k [R (D 665_a) - D 665_0] \cdot v}{V \cdot L \cdot 1000}$$

$$A = \frac{1}{Kc} \times 1000$$

Kc = coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle a à 665 nm = 90,8

$$K = \frac{R}{R - 1} = 2,43$$

$$R = \frac{D 665_0}{D 665_a} \text{ max} = \text{rapport obtenu pour la chlorophylle a pure} = 1,7$$

D 665₀ = absorption à 665 nm avant acidification

D 665_a = absorption à 665 nm après acidification

V = volume d'eau filtrée en litres

v = volume de l'extrait acétonique en ml

L = chemin optique de la cuve de mesure (en cm).

III - 2.1.7. Indice de diversité pigmentaire

Il est donné par le rapport densité optique à 430 nm/densité optique à 665 nm d'un extrait acétonique de pigments. Il révèle l'importance relative des pigments accessoires comparés à la chlorophylle a et a été proposé par MARGALEF (1964) pour traduire l'état physiologique d'une communauté phytoplanctonique. Un rapport bas correspond à une communauté active, riche en chlorophylle a.

III - 2.1.8. Comparaison des méthodes spectrophotométrique et fluorimétrique

D'après NEVEUX (1976), on constate une relative équivalence des deux méthodes, pour des concentrations de chlorophylle a inférieures à 0,75 µg par litre d'acétone à 9 %. Pour des concentrations supérieures, la perte de linéarité entre la fluorescence de l'extrait et la quantité de chlorophylle a (alors qu'elle persiste en densité optique) rend pratiquement inutilisable la fluorimétrie. (Fig. 29).

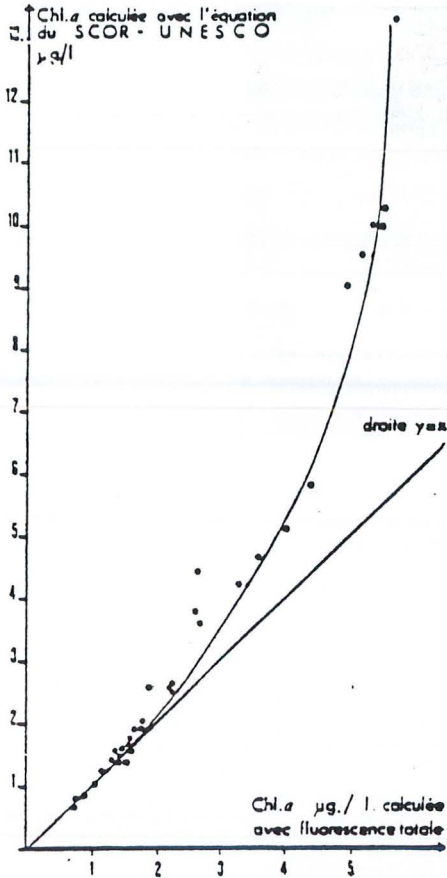


Figure 29 :

Comparaison entre les concentrations de chlorophylle a calculées soit à partir de la fluorescence totale, soit à partir de la densité optique (SCOR UNESCO, 1966) d'extraits, dans l'acétone à 90 %, de communautés de phytoplancton

III - 2.2. Carbone et Azote organiques particuliers

Présents dans toutes les cellules, leur analyse offre un intérêt certain pour l'estimation de la biomasse et l'étude de l'état physiologique des populations par l'intermédiaire du rapport C/N (MOAL et Coll., 1977 ; ANDERSON et Coll., 1980).

Deux types de méthodes peuvent être utilisés : l'oxydation par voie humide ou la combustion par voie sèche. L'automatisation, de cette dernière dans des appareils utilisant la combustion du matériel organique en présence d'un oxydant et la chromatographie en phase gazeuse permet actuellement de réaliser ces analyses de manière routinière.

III - 2.2.1. L'analyseur élémentaire CARLO ERBA, Modèle 1106 (fig. 30 et 31)

Les échantillons sont pesés dans des capsules en métal oxydable (ici l'étain) et introduits dans un tube de quartz vertical chauffé à 1023°C puis traversé par un courant d'Hélium de débit constant. Au moment de l'introduction de l'échantillon, le gaz vecteur est enrichi en oxygène par provoquant la formation d'un "flash" de combustion déclenché par l'oxydation de la capsule métallique.

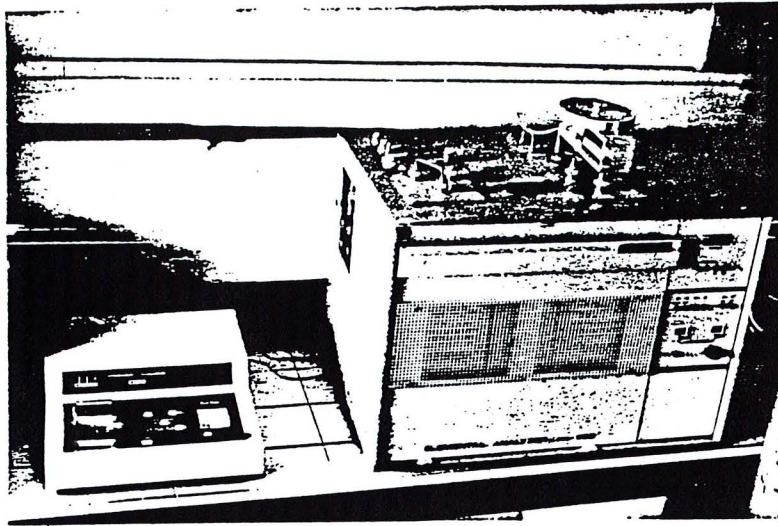


Figure 30 : Analyseur C.H.N. CARLO ERBA
Modèle 1106

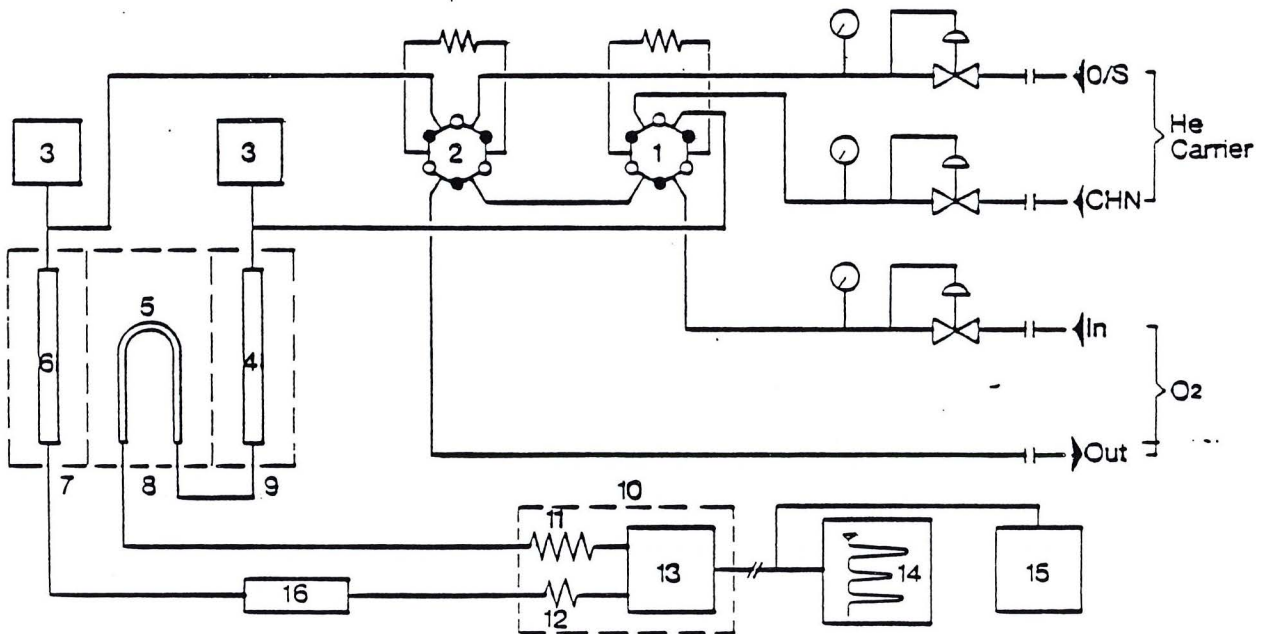


Figure 31 : Schéma de l'analyseur "Carlo Erba" modèle 1106.

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Oxygen injection valve (CHN) | 9. Combustion furnace (CHN) |
| 2. Oxygen injection valve (S) | 10. Thermostatted oven |
| 3. Samplers | 11. Chromatographic column (CHN) |
| 4. Combustion reactor (CHN) | 12. Chromatographic column (O/S) |
| 5. Reduction reactor (CHN) | 13. Detector |
| 6. Pyrolysis/combustion reactor (O/S) | 14. Recorder |
| 7. Pyrolysis/combustion furnace (O/S) | 15. Integrator |
| 8. Reduction furnace (CHN) | 16. Trap |

L'oxydation quantitative se termine par passage des gaz de combustion à travers Cr_2O_3 qui sert de catalyseur.

Ces gaz sont ensuite entraînés dans un tube de réduction rempli de limaille de Cuivre et chauffé à 650°C permettant ainsi la réduction de l'oxyde d'azote et l'élimination de l'oxygène excédentaire.

Après refroidissement à 100°C , l'introduction du mélange gazeux dans les colonnes chromatographiques permet la séparation des différents constituants : $\text{N}_2 - \text{CO}_2 - \text{H}_2\text{O}$ -, leur détection par des catharomètres permet après étalonnage par des substances de teneurs exactes en Azote et Carbone connues (Acétanilide ou cyclohexanone 2,4 dinitro-phényldrazone) de déterminer celles des échantillons. Un enregistreur permet de visualiser les pics obtenus tandis qu'un intégrateur ICAP V (DELSI) nous communique leur surface en unités arbitraires. (Fig. 32).

III - 2.2.2. Préparation des échantillons

.....
Durant toutes les opérations il est indispensable de s'entourer de toutes les précautions inhérentes à la microanalyse.

Avec le phytoplancton naturel la filtration s'impose. Les filtres utilisés sont des filtres WHATMAN GF/C de 47 mm de diamètre, préalablement calcinés pendant 3 heures au moins à 300°C . Ils sont manipulés avec des pinces très propres de façon à leur éviter tout contact avec une substance organique quelconque. De même, les manipulateurs doivent constamment s'abstenir de fumer dans les laboratoires où sont effectuées les différentes manipulations. Déposés dans des coupelles d'aluminium référencées et également calcinées, les filtres sont prépesés avant filtration.

Les filtrations sont effectuées sous vide contrôlé, au moyen d'une rampe de filtration MILLIPORE par exemple, de façon à charger le filtre le plus possible tout en évitant à la fois l'éclatement des cellules et un temps de filtration trop long (recommandation de MAESTRINI).

Les échantillons sont séchés à l'étuve à 48°C , 24 heures au moins. Après retour à température ambiante dans un dessiccateur, les filtres sont à nouveau pesés en entier puis après avoir découpé les bords du filtre n'ayant pas recueilli de cellules.

Une moitié du filtre est alors décarbonatée 30 minutes sous vapeurs d'acide chlorhydrique concentré, puis séchée à nouveau à l'étuve à 48°C .

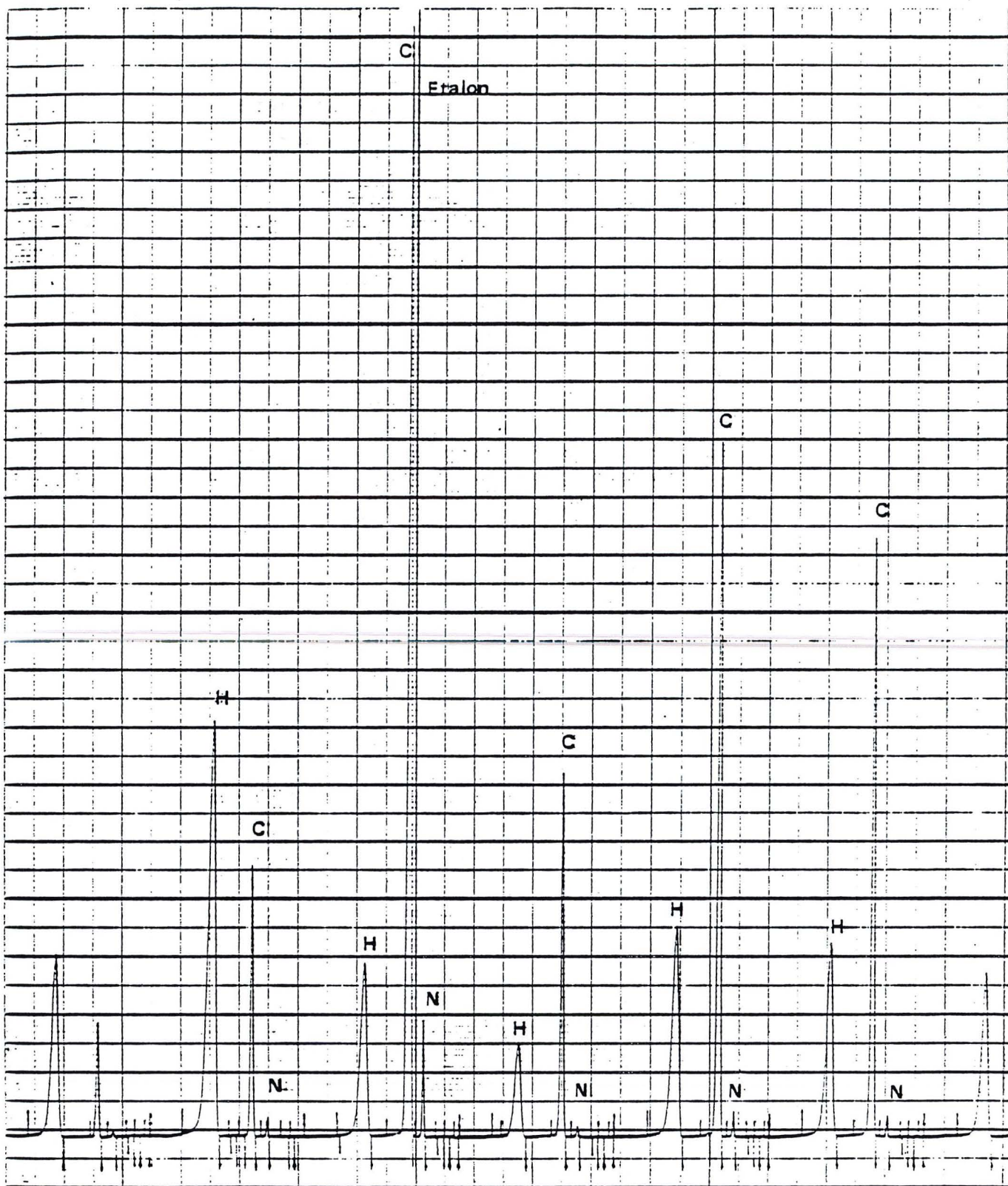


Figure 32 : Exemple d'enregistrement obtenu avec l'analyseur C, H, N.

Après broyage du filtre dans un micro-broyeur GRINDOMAT équipé de bols et de billes d'agate, on pèse à l'aide d'une microbalance SARTORIUS modèle 7085-01 quelques aliquotes de chaque partie du filtre, dans des capsules d'étain. Ces capsules préalablement lavées au tétrachlorure de Carbone puis à l'acétone (selon les recommandations CARLO ERBA) sont alors fermées et placées dans l'échantillonneur automatique.

III - 2.2.3. Analyse

Mis en chauffe la veille, les débits

des différents gaz étant réglés, l'appareil est purgé par déclenchement d'une analyse "à vide". Lorsque la colonne d'oxydation vient d'être changée, elle doit être "amorcée" par passage d'une dizaine d'échantillons d'essai ; une purge et l'appareil est alors prêt à fonctionner.

Dans l'échantillonneur, on place les échantillons par séries de 10 encadrées d'étalons et de blancs (capsules vides et capsules chargées de filtre vierge).

Le temps d'analyse est de l'ordre d'une dizaine de minutes par échantillon.

III - 2.2.4. Exploitation des résultats : Calcul des concentrations de Carbone et d'Azote

L'étalonnage de l'appareil conduit au calcul d'un coefficient K_N ou K_C (relativement à l'azote ou au carbone)

$$K_{(N \text{ ou } C)} = \frac{\% t \times WS}{I}$$

% t = pourcentage théorique de Carbone ou d'Azote contenu dans la substance étalon (% C = 71,09 et % N = 10,36 dans le cas de l'acétanilide)

WS = quantité de substance étalon analysée en μg

I = surface du pic de Carbone ou d'Azote correspondant à l'étalon, soustraction faite du blanc approprié (capsule vide dans ce cas).

Le calcul du pourcentage de Carbone ou d'Azote de chaque échantillon est alors donné par la formule :

$$\%N \text{ ou } C = \frac{K_{N \text{ ou } C} \times I}{m}$$

I = surface du pic C ou N de l'échantillon soustraction faite du blanc

m = masse de matières en suspension analysée en $\mu\text{g} = \frac{m_1 (M_1 - M_0)}{m_0}$

avec : M_0 = masse du filtre vierge ; M_1 = masse du filtre après filtration ;

m_0 = masse du filtre découpé ; m_1 = masse de l'aliquote prélevé pour

Il suffit ensuite de ramener à la masse de matières en suspension contenue dans un litre d'eau de mer filtrée pour connaître la concentration carbonnée et azotée en $\mu\text{g}/\text{l}$.

III - 2.2.5. Précision des mesures

Après avoir vérifié la linéarité des catharomètres (fig. 33) nous avons calculé la moyenne des coefficients K obtenus à partir de 5 analyses de cyclohexanone, l'écart-type ainsi que le pourcentage de variabilité. Ce pourcentage est de 0,790 pour le Carbone comme pour l'Azote.

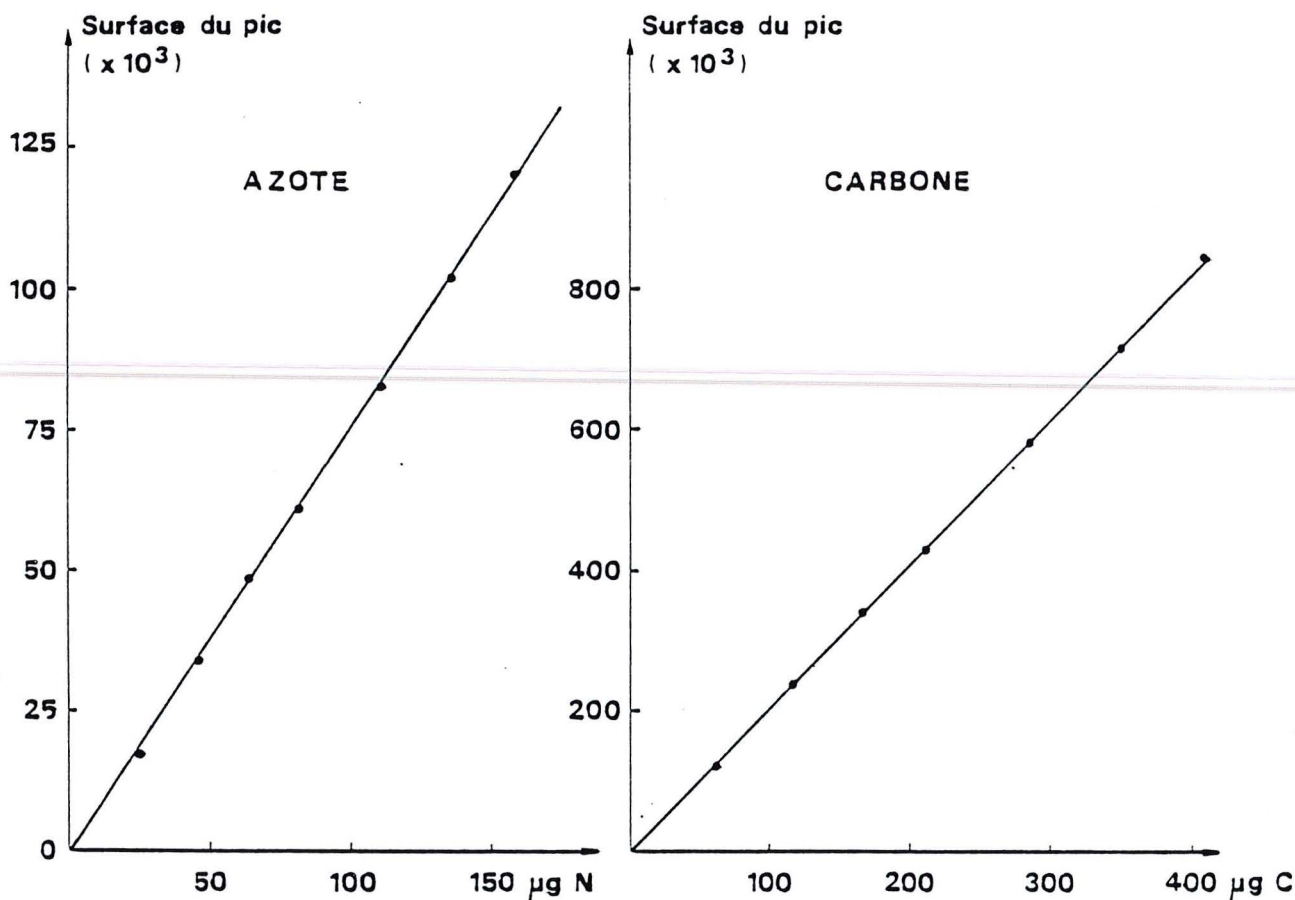


Fig. 33 : Vérification de la linéarité des catharomètres

(gamme : 0,1 à 0,8 μg de cyclohexanone)

Des essais effectués sur des algues séchées et broyées donnent, sur une série de 9 mesures, un pourcentage de variabilité par rapport à la moyenne d'1,3 M sur l'Azote et d'1,2 M sur le Carbone.

Des essais identiques et complémentaires à partir du matériel particulaire sont en cours de réalisation et devraient permettre de dissocier l'erreur d'analyse due à la faible charge des filtres, de l'erreur due à l'hétérogénéité du prélèvement lui-même.

LISTE DES APPAREILS DE MESURE DONT DISPOSE LA STATION MARINE

MATERIEL DE "TERRAIN"

- FIELDLAB Oxygène analyzer BECKMAN
- Fluorimètre TURNER modèle 111
- Phmètre KNICK Portamess 651
- pHmètre Radiometer 29
- Quantum/Radiometer/Photometer LI-COR - modèle LI-185 B
- Spectrophotomètre de terrain DR/2 HACH modèle 2504 équipé d'une cellule d'expansion
- Thermomètre digital de surface Quick
- Thermomètre digital LAUDA R44/2 équipé d'un commutateur M 10/2 à 10 positions et de 4 thermomètres à résistance de platine.
- Thermomètres à renversement RICHTER et WIESE
- Turbidimètre DRT 1000
- Salinomètre portable BECKMAN R S 5-3

MATERIEL DE "LABO"

- Autoanalyzer II TECHNICON - 4 chaînes avec système de traitement des résultats HEWLETT PACKARD
- Dosimat E 535 et Titrator E 526 METROHM HERISAU
- Ensemble de microanalyse constitué d'un C H N CARLO ERBA, modèle 1106, couplé à un intégrateur ICAP 5 et un enregistreur
- Ensemble de polarographie à gouttes de mercure E.G.G.
- Spectro-photomètre BECKMAN modèle UV 24 avec enregistreur et programmeur de longueurs d'onde.

BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME, 1980 - Background papers and supporting data on the International Equation of State of Seawater - UNESCO Tech. Pap *In Mar. Sci.* n° 38.
- ANONYME, 1978 - Background papers and supporting data on the Practical Salinity Scale - UNESCO Tech. Pap *In Mar. Sc.* n° 37.
- ANONYME, 1966 - Détermination of photosynthetic pigments in sea-water - UNESCO, Monogr. Océanogr. Methodol., 1, 69 p.
- ANONYME, 1981-1982 - International Marine Science News Newsletter n° 30, Special issue .
- ANONYME, 1977 - Manuel des méthodes de prélèvements et d'analyses. Caractéristiques physicochimiques et hydrobiologiques, Vol. 1 - Réseau National d'observation de la Qualité du Milieu Marin.
- ANONYME - Tables océanographiques internationales - UNESCO Tech. Pap. *In Mar. Sci.* n° 39.
- ANDERSON J.T., ROFF J.C., 1980 - Seston Ecology of the surface Waters of Hudson Bay. *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, 37 (12), 2242-2253.
- ATKINS W.R.G., JENKINS P.G. et WARREN F.J., 1954 - The suspended matter in sea-water and its seasonal changes as affecting the visual range of Secchi disc. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 33, 497-509.
- BANSE R., FALLS C.P., et HOBSON L.A.T., 1963 - A gravimetric method for determining suspended matter in sea water using Millipore filters. *Deep-Sea Research*, 1963, Vol. 10, pp. 639-642.
- DEWARUMEZ N., 1977 - Rapport d'essais sur la détermination de l'ammoniac dissous dans l'eau de mer *In Etude Ecologique de projet du site de Gravelines 2ème cycle - SMW/CNEXO.*
- KIEFER D.A., 1973 *In* Mesure de la Biomasse phytoplanctonique par J. NEVEUX, M. FIALA, G. JACQUES - Laboratoire ARAGO de Banyuls sur Mer (Stage organisé du 9.10. au 4.11.78 avec l'aide du C.N.R.S. (Setar) de la Mission de la Recherche et de l'UNESCO).
- KOROLEFF J., 1969 - Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Int. Coune. Explor. Sea, C.M.* 1969/C. 9 and addendum, April 1970.
- LEWIS E.L. et PERKIN R.G., 1981 - The practical salinity scale 1978 : Conversion of existing data. *Deep-Sea Res.* 28 A (4), 307-328.
- LORENZEN C.J., 1966 - A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, 13, 223-227.

- LORENZEN C.J., 1967a - Determination of chlorophyll and pheopigments : spectrophotometric equation. *Limnol. Oceanogr.*, 12, 343-346.
- MAESTRINI S., KOSSUT M.G., REYNAUD C. - Note technique à propos de l'analyse de l'azote et du carbone particulaires par pyrolyse et chromatographie en phase gazeuse. Station Marine d'Endoume - Marseille.
- MARGALEF R., 1960 - Valeur indicatrice de la composition des pigments du phytoplancton sur la productivité, composition taxinomique et propriétés dynamiques des populations. *Rapp. Comm. int. Mer. Médit.*, 15 (2), 277-281.
- MOAL J., SAMAIN J.G., LE COZ J.R., 1980 - C/N et contrôle de physiologie des cultures de phytoplancton. Centre Océanologique de Bretagne, 8 pp.
- MULLIN J.B. et RILLEY J.P., 1955 - The colorimetric determination of Silicate with special reference to sea and natural waters. *Analytica chimica Acta* 12, 162-176.
- NEVEUX J., 1976 - Dosage de la chlorophylle a et de la phéophytine a par fluorimétrie. *Ann. Inst. Oceanogr.*, Paris, 52 (2), 165-174.
- RICHARDS F.A. et THOMPSON T.G., 1952 - The estimation and characterization of plankton populations by pigments analyses II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.*, 11, 156/172.
- RODIER J., 1978 - L'analyse de l'eau - Dunod Technique.
- SOLORZANO L., 1969 - Determination of ammonia in natural water by the phenol hypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14, (5), 799-801.
- STRICKLAND J.D.H. et PARSONS T.R., 1968 - A practical Handbook of Seawater Analyses. Fisheries Res. Board of Canada, Ottawa. Bulletin 167.
- TREGUER P. et LE CORRE P., 1974 - Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'Autoanalyser II Technicon R. Lab. *Oceanogr. chimique*, Univ. Bretagne Occidentale, Brest, 59 p.
- YENTSCH C.S. et MENZEL D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, 10, 221-231.

C H A P I T R E I I

NUMERATION DU PHYTOPLANCTON

PRODUCTION PRIMAIRE

Hubert GROSSEL

IFREMER/Centre de Boulogne
Département "Environnement Littoral"

S O M M A I R E

1. Numération du phytoplancton au microscope	1
2. Indices de diversité	2
3. Production primaire	2
REFERENCES	6

METHODOLOGIE

NUMERATION DU PHYTOPLANCTON - PRODUCTIVITE PRIMAIRE

Les analyses du phytoplancton, de la production primaire, et de l'hydrologie en général concernent les mêmes prélèvements d'eau de mer.

1 - Numération du phytoplancton au microscope

Les échantillons (100 à 125 ml) sont fixés au formol. La méthode d'étude est celle d'UTERMOHL, adaptée au phytoplancton marin par STEEMANN NIELSEN en 1933. Comptages et déterminations spécifiques se font avec un microscope inversé, en contraste de phase, avec des grossissements proches de 300 x (selon le microscope) pour le microplancton et proches de 500 x pour les nanoplanctontes. Le volume des cuves à sédimentation (5 à 100 ml) est fonction de la turbidité (les particules en suspension entravent comptages et déterminations, après sédimentation) et de l'abondance du phytoplancton).

Plusieurs échantillons de la même masse d'eau (3 en général) sont ainsi mis à sédimenter, sur lesquels plusieurs diamètres d'observation au microscope sont effectués. Les comptages obtenus sont ramenés au nombre correspondant par cm^3 .

Une autre méthode de dénombrement, utilisant des cotations d'abondances (Frontier, 1969) permet d'obtenir une information quasi équivalente au niveau des espèces et de la diversité spécifique, tout en permettant une augmentation de l'échantillonnage spatial, traduisant une amélioration de la significativité des résultats (Déraux, Millerioux et Amblard, 1983).

2 - Indices de diversité

La structure d'une population peut s'exprimer en pourcentage d'abondance (ou de dominance) d'une espèce par rapport au nombre total d'individus, ceci étant calculé espèce par espèce.

a . L'indice de diversité de SHANNON-WEAVER, exprimé en bits/cellule ou en bits/individu (MARGALEFF, 1974) permet en une seule donnée d'apprécier la diversité spécifique d'une population :

$$H \text{ (bits/}\phi\text{)} = - \sum p_i \log_2 p_i$$

ou $p_i = \frac{n_i}{N}$ n_i = nombre d'individus de chaque espèce
 N = nombre total d'individus.

b . Afin de pouvoir comparer entre elles les différentes populations dont le nombre d'espèces varie de l'une à l'autre, l'équitabilité donne le rapport de la diversité réelle à la diversité maximale (DAGET, 1976) :

$$E = \frac{H}{\log_2 N}$$

3 . Productivité Primaire

La méthode utilisée est celle mise au point par Steemann Nielsen en 1952 et reprise par Brouardel et Rinck en 1963.

Principe : On introduit dans l'échantillon d'eau une quantité infime mais connue de ^{14}C sous forme de bicarbonate de Sodium. Après avoir exposé l'échantillon à la lumière, on recueille le plancton sur un filtre dont on mesure la radioactivité.

Selon l'état de la mer et la force des courants, on peut envisager soit une incubation in situ, soit en incubateur à lumière artificielle.

Sur les lieux de prélèvements ou le plus tôt possible après, des échantillons de 100 ml sont inoculés avec 1 ml de solution de $\text{Na H}^{14}\text{CO}_3$ dosé à 4 microcuries. A chaque niveau de prélèvement, correspondent deux échantillons incubés dans un échantillon à parois opaques. Après quatre heures d'incubation, les échantillons sont filtrés sur membranes Sartorius de porosité 0,45 μ .

Le comptage se fait par scintillation liquide, en laboratoire. La méthode de la standardisation interne permet de prendre en compte l'effet de quenching dû aux matières en suspension.

Cette méthode (in G.Simonet et M.Oria,) consiste, dans un premier temps, à mesurer la radioactivité de l'échantillon. Cette radioactivité est exprimée en cpm. Dans un deuxième temps, on ajoute dans l'échantillon une certaine quantité du même radio-isotope qui constitue un standard interne (celui-ci doit avoir la même solubilité que l'échantillon). La radioactivité ajoutée doit être connue en valeur réelle (d p m). Elle peut être comprise entre 10 et 50 000 d p m. La radioactivité de l'échantillon est alors à nouveau mesurée. La différence de radioactivité observée entre deux mesures correspond à la radioactivité ajoutée. Connaissant cette valeur et celle de la radioactivité réelle, il est alors possible de calculer l'efficacité de comptage. On admet que les efficacités de comptage du standard ajouté et de l'échantillon initial sont les mêmes.

L'exemple suivant illustre cette méthodologie :

- | | | |
|-----|--|------------|
| 1- | 1ère mesure de radioactivité
en c p m | 3 000 cpm |
| 2 - | Addition d'un standard de | 10 000 dpm |

- | | |
|---|-----------|
| 3- 2ième mesure de radioactivité
en c p m | 7 000 cpm |
| 4- radioactivité due à l'addition
des 10 000 d p m | 4 000 cpm |
| 5- Efficacité de comptage =
radioactivité due au standard/10 000 dpm | 0.4 |
| 6- Radioactivité réelle des échantillons
en dpm = radioactivité mesurée/efficacité | 7 500 dpm |

Cette méthode de correction du quenching due à la turbidité est la plus sûre. Une autre méthode, celle du rapport des canaux, offre l'avantage d'une plus grande simplicité de mise en oeuvre, mais l'inconvénient d'une moindre précision que celle de la standardisation interne.

Le résultat des comptages, exprimé en coups par minute, est ramené en mgC/m³ au moyen de la formule suivante :

$$\frac{b \times c}{a} \times \frac{12}{44} \times 10^3$$

dans laquelle :

a = activité totale introduite sous forme de NaH¹⁴CO₃ = 8,888 888 10⁶ dpm.

b = activité du phytoplancton retenu sur le filtre en désintégration par minutes cpm = cpm : Rd dépendant particulièrement des matières en suspension.

C = teneur en CO₂ de l'eau, estimée à 100 ml/l.

12 = poids moléculaire du carbone

44 = poids moléculaire du CO₂

10³ = permet de ramener au m³.

Indice Production-Biomasse

A partir de données de production primaire et de chlorophylle a, on peut calculer l'indice production/biomasse (STRICKLAND, 1965).

$$\frac{\text{Production primaire (mgC/m}^3 \text{ / heure)}}{\text{Chlorophylle a (mg/m}^3 \text{)}}$$

Considérant que la chlorophylle a est un bon indicateur de la biomasse autotrophe (micro- et manoplancton), ce rapport permet d'apprécier l'état physiologique des populations phytoplanctoniques. Il est donc un des paramètres principaux d'estimation d'un possible impact sur les populations phytoplanctoniques.

R E F E R E N C E S

BROUARDEL J., RINCK E., 1963.

Mesure de la production de matière organique en Méditerranée, dans les parages de Monaco à l'aide du 14 C.

Ann. Inst. Ocean Tome XL fasc.2, pp 109 - 164

DAGET J., 1976.

Les modèles mathématiques en Ecologie

Collection d'Ecologie, 8, Ed. Masson, Paris, p 172

DEVAUX J., MILLERIOUX G., AMBLARD CH., 1983.

Echantillonnage du phytoplancton lacustre.

pp. 291 - 310, in Stratégie d'échantillonnage en Ecologie.

Masson - P.U.L. Eds. 1983.

ERARD E., 1984.

Etude bibliographique de quelques espèces planctoniques et benthiques littorales de la Manche. Vol. I. Espèces phytoplanctoniques (rapport pour EDF) - p. 93.

FRONTIER S., 1969.

Sur une méthode d'analyse faunistique rapide du zooplancton

J. exp. mar. Biol. Ecol., 3 : 18 - 26.

MARGALEF R., 1974.

Ecologia

Ed. Omega, Barcelone, p 951.

SIMONET G., et ORIA M.,

Les mesures de radioactivité à l'aide des compteurs à scintillation liquide

Ed. Eyrolles.

STEEMANN NIELSEN, E., 1933.

Über quantitative Untersuchung von marinem Plankton mit Utermöhls umgekehrten Mikroskop.

J. Cons. CIEM, vol. 8, n°2, p 201 - 210.

STEEMAN NIELSEN E., 1952.

The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea.

J. Cons. 18, p 117 - 140.

STRICKLAND J.D.H., 1965.

Production of organic matter in the primary stages of the marine food.

pp 477 - 610 in RILEY J.P. and SKIRROW G. eds. Chemical oceanography, vol 1, Academic Press. New York, pp 712.

UTERMÖHL H., 1931.

Neue Wege in der quantitativen Erfassung des planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons).

Verh. int. Ver. Theor. angew. Limnol, vol-5, n° 2, p 567 - 596.

Normes UNESCO

CHAPITRE III

MICROBIOLOGIE

Régis DELESMONT

Institut Pasteur de Lille -
Laboratoire Littoral de Gravel

S O M M A I R E

Température	1
Chlore	1
Halofomes volatils	1
Dénombrement des germes totaux	2
Germes aérobies viables	3
Vibrions halophiles à 37°C	3
Pollution fécale	4
Activité bactérienne	5
BIBLIOGRAPHIE	8

TEMPERATURE

La mesure est réalisée au 1/10° de degré avec un thermomètre ACIP à sonde platine.

CHLORE

Le dosage du chlore est réalisé par la méthode à la N.N diéthylparaphénylène-diamine (D.P.D) avec un colorimètre portatif (HACH DR 100) ou une trousse CIFEC.

HALOFORMES VOLATILS

Les haloformes suivants sont recherchés par chromatographie en phase gazeuse et détecteur à capture d'électrons par la technique Headspace:

- dichloro 1-1 éthylène
- chloroforme
- tétrachlorure de carbone
- dichlorobromométhane
- trichloréthylène
- dibromochlorométhane
- tétrachloréthylène
- bromoforme

.chromatographe	:Girdel,série 30
.détecteur	:à capture d'électrons (Source N_i^{63} , alimentation pulsée)
.colonne	:longueur 2.10 m Ø 2 mm remplissage:6% DC 20C sur Chromosorb W/AW DMCS (80-100 mesh)
.gaz porteur	:Azote C
.températures de travail	:Injecteur 150° Colonne 60° Détecteur 200°

DENOMBREMENT DES GERMES TOTAUX

Une méthode microscopique directe, en épifluorescence, est utilisée pour le dénombrement des bactéries totales:

- filtrer 10 ml d'eau, éventuellement diluée, sur une membrane Nucléopore (0.2 μm ; \varnothing 47 mm), teinte en noir avec de l'Irgalan Black BGL (0.2 % l'acide acétique à 2%-24 h à 30°C).
- casser le vide et ajouter 10 ml d'orangé d'acridine (Fluka MG 301.82) (solution au 1/30COC dans du tampon phosphate 0.1 M 7.4 fraîchement dépoussiérée par 2 filtrations à 0.2 μm .)
- éliminer le colorant après 5 minutes en rétablissant le vide et déposer sur une boîte de tampon gélosé (pH 7.4 tampon phosphate 0.1 M, agar 12 g/l)
- examiner sous l'huile non fluorescente, en épifluorescence, au grossissement 1000 x.

Le microscope utilisé est un Leitz Ortoplan avec brûleur à vapeur de mercure 200 W, filtres d'excitation bleu vert BG 38 (5 mm) + bleu BG 12 (3 mm), filtre dichroïque TK 495 nm et filtre d'arrêt K 510 nm, objectifs PL Apo Oel 100/1.32 et oculaires periplan GW 10 x M modifiés par l'adjonction de diaphragmes \varnothing 14mm permettant de délimiter un champ uniformément illuminé.

- compter, sur 20 champs en 2 diagonales croisées; les nombres de cellules bactériennes .
- le nombre de germes totaux est, par ml:

$$N = \frac{n \cdot R}{v}$$

avec n = nombre moyen de bactéries par champ,

$$R = \frac{\text{surface utile de membrane}}{\text{surface d'un champ}} \text{ soit } 6 \cdot 10^4 \text{ avec les diaphragmes}$$

V = volume filtré, en ml

GERMES AEROBIES VIABLES

Inoculation : avec 0.1 ml de l'eau (ou de dilutions décimales en eau de mer synthétique stérile), en surface, à l'étaleur sur gélose 2216 E de ZoBell

-Gélose de ZoBell	bacto-peptone	:	5g
	extrait de levure	:	0.1 g
	FePO ₄	:	0.1 g
	Agar	:	15 g
	eau distillée	:	250 ml
	eau de mer Synth.	:	750 ml
	pH	:	7.4-7.6
	stérilisation	:	20 min. à 120°C
-Eau de mer Synthétique	eau distillée	:	10 litres
	NaCl	:	245.85 g
	MgCl ₂ , 6H ₂ O	:	109.45
	Na ₂ SO ₄ , 10H ₂ O	:	93.01
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	:	15.29
	KCl	:	6.955
	NaHCO ₃	:	2.01
	KBr	:	1.006
	H ₃ BO ₃	:	0.272
	SrCl ₂	:	0.251
	NaF	:	0.031
	pH	:	7.8

Incubation : à 20°C, pendant 20 jours

Comptage du nombre des colonies pour deux dénombrements distincts.

VIBRIONS HALOPHILES A 37°C

La méthode utilisée est celle du N.P.P (nombre le plus probable) à trois tubes par dilution

-ensemencer les tubes de milieu BTB d'AKIYAMA. (les volumes supérieurs à 10 ml sont filtrés sur membrane 0.45 µm et les membranes portées dans le tube de milieu)

-dès le début de la culture (18 h environ), isoler sur gélose TCBS (KOBAYASHI et al. 1963).

-repiquer plusieurs colonies de chaque type et compter les germes présentant les caractères suivants:

-production d' H ₂ S sur TCBS	-
-Glucose fermenté sur milieu de Kligler	+
-Lactose fermenté sur milieu de Kligler	-
-production de gaz sur milieu de Kligler	-
-production d'H ₂ S sur milieu de Kligler	-
-coloration de Gram	-
-aspect en bacilles ou virgules	+
-Oxydase (à partir de gélose ordinaire avec NaCl 3%)	+
-Galactosidase, en 2h (avec NaCl 3 %)	-
-culture sur eau peptonée (avec NaCl 0%)	-
-culture sur eau peptonée (avec NaCl 3%)	+
-culture sur eau peptonée (avec NaCl 7%)	+
-sensibilité au composé vibriostatique C/129 sur gélose NaCl 1%	+

Caractères étudiés pour la détermination complète:

-Lysine décarboxylase] milieux de Moëller avec NaCl3%
-Ornithine décarboxylase	
-Arginine dihydrolase	
-Eau peptonée + NaCl 10 %	
-fermentation du Saccharose (NaCl 3 %)	
-Production d'acétoïne selon Richard (1972)	

POLLUTION FECALE

La mesure de la pollution fécale repose sur la recherche des germes indicateurs: Coliformes totaux, Escherichia coli et Streptocoques fécaux.

La méthode utilisée pour ces dénombrements, dite du nombre le plus probable (N.P.P.), est une méthode en milieu liquide à trois tubes par dilution. Elle consiste à ensemercer plusieurs séries de trois tubes par une gamme de dilution de 10 en 10.

Les manipulations sont réalisées en deux temps pour chacun des indicateurs étudiés:

-dans un premier temps un test présomptif est effectué sur un milieu riche, qui permet une bonne revivification des populations bactériennes mais n'est pas spécifique.

-dans un second temps un test confirmatif effectué avec un milieu sélectif et, éventuellement, à une température plus élevée, permet de s'assurer que les populations dénombrées sont bien celles recherchées.

	tests présomptifs	confirmation
Coliformes totaux	bouillon lactosé au bromocrésol pourpre (48h à 30°C)	bouillon lactosé bilié au vert brillant (48h à 37°C)
<u>Escherichia coli</u>	"	milieu de Schubert (24 h à 44°C)
Streptocoques fécaux	bouillon de Rothe (48 h à 37°C)	bouillon de Litsky (48 h à 37°C)

ACTIVITE BACTERIENNE

A titre d'estimation de l'activité bactérienne, on mesure la vitesse d'asorption (assimilation et respiration) de glucose marqué au C^{14} , à cinq concentrations à l'obscurité.

Filtrer l'eau à 60 μ m.

La répartir à raison de 100 ml dans les flacons à transfusion contenant $3.5 \cdot 10^5$ cpm de ^{14}C glucose (activité spécifique : 313 μ Ci/ μ M et du glucose froid (1,5,10,15, et 20 μ g/l).

Une série témoin est effectuée avec de l'eau stérilisée par addition préalable (15 minutes) de $HgCl_2$ (1 ppm).

-traitement des données de "turn-over": calcul de l'activité hétérotrophe, du taux de respiration et du "potentiel hétérotrophe" V_M .

Dans l'hypothèse où l'absorption du glucose suit une cinétique à saturation, du type Michaëlis-Menten, les temps de turn-over varient linéairement avec les concentrations, et en particulier:

$$B = \frac{1}{V_M} (S + B_0)$$

avec : B_0 = temps de turn-over d'absorption à la dose zéro de glucose ajouté, soit à la concentration naturelle (indosable) en eau de mer. Ce terme est un indice de l'activité hétérotrophe réelle.

V_M = vitesse maximum d'absorption, ou activité hétérotrophe "potentielle" vis-à-vis du glucose, ou plus simplement "potentiel hétérotrophe"

On peut montrer dans cette hypothèse que l'abscisse à l'origine ($\frac{B_0}{1/V_M}$) est égale à $-(K_S + S_N)$ avec :

K_S = constante d'affinité de Michaëlis

S_N = concentration naturelle de glucose en eau de mer.

Un programme de calcul automatique a été établi, qui permet d'obtenir successivement :

- la droite des moindres carrés pour les temps d'absorption (B)
- l'inverse de la pente, soit V_M (en $\mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) - (potentiel hétérotrophe),
- l'ordonnée à l'origine (B_0), indice inverse d'activité hétérotrophe réelle (en heures)
- l'abscisse à l'origine $-(K_S + S_N)$ ($\mu\text{g/l}$)
- les droites des moindres carrés pour les temps d'assimilation (A) et de respiration (R), sous la contrainte qu'elles passent par $(-(K_S + S_N), 0)$.
- agiter, puis prélever 2 ml, à compter en flacons à scintillation contenant 4 ml de Lumagel.
- fermer les flacons par des bouchons à deux trous, dispositif de bullage fermé.
- mettre en incubation à la température du prélèvement, à l'obscurité.

La durée d'incubation est réglée de façon à obtenir une fraction absorbée 10%, pour éviter des limitations en oxygène ou autres éléments nutritifs. Elle est fonction de la température, des résultats précédents, du nombre de germes en fluorescence.

- arrêter l'absorption par addition de 0.5 ml H_2SO_4 (N).
- la fraction respirée est récupérée par bullage dans des pots à scintillation contenant 9 ml de Lipoluma + 0.5 ml de Lumasolve + 0.5 ml de phénéthylamine.
- la fraction assimilée par les 100 ml d'eau est retenue sur filtre Millipore 0.45 μm et comptée dans 10 ml de liquide à scintillation de Kennedy.

Calcul du "potentiel hétérotrophe" V_M

Calcul des temps de turn-over pour l'assimilation (A_i), la respiration (R_i) et l'absorption totale (assimilation + respiration) (B_i), à une concentration S_i :

$$A_i = \frac{t \times N}{(F-T)} \quad (\text{en h})$$

$$R_i = \frac{t \times N}{(M-u)} \quad (\text{en h})$$

$$\frac{1}{B_i} = \frac{1}{A_i} + \frac{1}{R_i}$$

avec : t = temps d'incubation (en h)

N : radioactivité avant incubation (t_0), en cpm pour 1 ml

F : radioactivité fixée sur le filtre après incubation et décarbonatation, en cpm pour 1 ml filtré, pour le filtre d'essai.

T : radioactivité retenue sur le filtre, après incubation et décarbonatation (en cpm pour 1 ml filtré) pour l'eau traitée avec $HgCl_2$ (valeurs mesurées aux concentrations 1, 10, et 20 $\mu g/l$, interpolées pour 5 et 15 $\mu g/l$.)

M : radioactivité retenue dans le piège à CO_2 pour la prise d'essai

u : radioactivité retenue dans le piège à CO_2 pour l'eau traitée avec $HgCl_2$.

-les ordonnées à l'origine de ces droites (activités assimilatrice A_0 et respiratoires R_0 réelles) (en h)

-la fraction minéralisée A_0 (en %)

$$\frac{A_0}{A_0 + R_0}$$

B I B L I O G R A P H I E

AKIYAMA, S. et al., 1963.

Jap. J. Bact. : 18 : 255 - 259

BAROSS, J.A. et al., 1975.

J. Fish. Res. bd Cann : 32 : 1876 - 1879

BAUMANN, P. et al., 1973.

J.Bact. : 113 : 1144 - 1155

BAUMANN P. et BAUMANN L., 1977.

Ann. Rev. Microbiol ; 31 : 39 - 61

BOWMAN F. J. et al., 1978

Toxicol. and Appl. Pharmacology : 44 : 213

CARLUCCI A.F. et PRAMER D., 1960

Appl. Microbiol. : 8 : 243 - 256

COLWELL R.P. et KAPER J., 1977

Vibrio species as bacterial indicators of potential health hazards associated with water In : bacterial indicators Health hazards associated with water ASTM STP 635, A.W. HOADLEY et R.J. DUTKA Ed. American Soc. for testing and Materials 115 - 125

DALEY R.J. et HOBBIE J.E., 1975

Limnol. Oceanogr. : 20 : 875 - 882

DELATTRE J.M. et al., 1979.

Oceanol. Acta. : 2 (3) : 317 - 324

DELATTRE J.M. et DELESMONT R., 1979.

2ième journée de la thermo-écologie - I.S.T.P.M. : 537 - 551

DELESMONT R. et DELATTRE J.M., 1973.
Environn. Techn. Let : 4 : 265 - 270

DESMOND E.P. et al., 1984
I of clinical Microbiology : 122 - 125

DRAPEAU A.J., 1975.
Techn. Eau Assainissement : 342 : 17 - 20 (Belg)

ELTRINGHAM S.K., 1971.
Life in mud and sand. UNIBOOKS the English Universities Press Ltd 218 pp

HORIE S. et al., 1967.
Bull Jap. Sci Fish. : 33 : 126 - 130

HOBBIE, J.E. et CRAWFORD, OC, 1969
Verh. Int. Verein thero. angew. Limnol. : 17 : 725 - 730

HOBBIE J.E. et al., 1977.
Appl. Env. Microbiol : 33 : 1225 - 1228

HOSTGAARD-JENSEN P. et al., 1977.
J.W.P.C.F. : 49 : 1832 - 1841

HUGH R. et SAKAZAKI R., 1975.
Intern. J. Systematic Bacteriology : 25 : 389 - 391

KANEKO T. et COLWELL R.R., 1975.
Appl. Microbiol. : 29 : 269 - 274

Kaper J.B. et al., 1983.
I of System Bact. : 229 - 255

KOBAYASHI T. et al., 1963.

Jap. J. Bact. : 18 : 367

LAYCOCK R.A., 1974.

Mar. biol. : 25 (3) 223 - 231

MIYAMOTO Y.T. et KATO Y., 1961.

Jap. J. Microbiol : 5 : 477 - 486

MOLENDI J.R. et al., 1972.

Appl. Microbiol. : 24 : 444 - 448

PARSONS T.R., STRICKLAND J.DH., 1962.

Deep. Sea Res. : 8 : 211 - 222

PUGSLEY A.P. et EVISON L.M., 1974.

Can. J. Microbiol. : 20 - 1457

RODIER J., 1985.

L'analyse de l'eau. Dunod Technique.

ROOK J.J., 1974.

Water Treatment Exam : 23 : 234

ROOK J.J., 1976.

JAWWA : 68 : 3

SAKAZARI R. et al., 1963.

Jap. J. Med; sci Biol. : 16 : 161 - 188

SEKI H. et al., 1975.

Arch..Hydrobiol. : 75 : 297 - 305

SIMIDUU et al., 1971.

Can. J. Microbiol. : 17 : 1157 - 1160

THOMSON W.K., TRENHOLM D.A., 1971.

Can. J. Microbiol. : 17 : 545 - 549

ULITZUR S., 1975.

Microbiol. Ecol. : 1 : 127

VASCONCELOS G.J. et al., 1975.

Appl. Microbiol. : 29 : 557 - 559

WLODKOWSKI T.J., ROSENKRANZ H.S., 1975.

Mutation Res. : 31 : 39

WRIGHT R.T. et HOBBIE J.E., 1965.

Limnol. Oceanogr. : 10 : 22 - 28

WRIGHT R.T. et HOBBIE J.E., 1966.

Ecology : 47 : 447 - 464

ZIMMERMAN R. et MEYER-REIL LA., 1974.

Kicler Meeresforschungen XXX : 24

ZOBELL C. et CONN J.E., 1940.

J. Bact. : 40 : 223

ZOBELL C.E., 1946.

Marine Microbiology. Chronica Botanica Waltham, Mass 240 PP.

C H A P I T R E I V

Z O O P L A N C T O N

Geneviève LE FEVRE-LEHOËRFF

avec la participation de :
Annick DERRIEN, Jean-Yves QUINTIN
Gilles YOUENOU

L'illustration a été préparée par
Vic CHAPRON

SOMMAIRE

	p.
Introduction	2
Stratégie d'Echantillonnage	2
Marées	2
Courants	2
Répartition spatiale	2
Variations saisonnières	2
Microdistribution	3
Choix des niveaux d'échantillonnage	3
Types d'échantillons de zooplancton recueilli	3
Récolte des Echantillons et conservation	5
Feuille de mer	5
Heure	5
Point	5
Station	5
Angle de cable	5
Profondeur sondeur	5
Profondeur de pêche	5
Débit-mètre	7
Temps de trait	7
Numérotation des échantillons	7
Les types de filets et leur mode d'emploi ...	7
Trait vertical filet simple	9
Trait vertical filet triple	9
Trait horizontal	11
Méthode de pêche	11
Stockage des échantillons	13
Méthodes utilisées au laboratoire	13
Données quantitatives globales	15
Poids sec - Biomasse:	15
Matière organique totale	15
Carbone organique et azote organique ...	17
Analyse taxonomique	17
Sous échantillonnage	19
Comptage	19
Etude de la dynamique de populations des copepodes	21
Traitement des données et stockage	23

INTRODUCTION

Les techniques et méthodologies décrites ici ne concernent que celles utilisées dans les études de sites de centrales nucléaires (Gravelines, Penly, Paluel, Englesqueville, Flamanville et Plogoff) choisies en fonction des caractéristiques de la zone étudiée et des conditions de travail. Le choix des méthodes pourrait être différent dans d'autres circonstances et au besoin, des ouvrages généraux de méthodologie peuvent être consultés (UNESCO, 1968 ; BOUGIS, P., 1974 ; OMORI, M. et T. IKEDA, 1984).

STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage a été défini en tenant compte des caractéristiques des sites (marées importantes, courants intenses) et de l'objectif des études, c'est-à-dire acquérir la connaissance de l'abondance et la composition taxonomique du zooplancton, de ses variations saisonnières et de sa répartition spatiale. L'étude porte sur le mésoplancton dont la gamme de taille se situe entre 200 μ et 1000 μ .

Marées : les marées sont semi-diurnes sur le littoral du continent Nord-Ouest européen où l'écart entre la haute mer et la basse mer peut atteindre 13 mètres, en vive eau à Saint-Malo, par exemple.

Courants : l'existence de forts courants de marée est un des critères les plus importants du choix d'un site de centrale nucléaire de bord de mer. Ils favorisent la dispersion thermique des effluents. Cette caractéristique des sites cependant entraîne des difficultés techniques d'échantillonnage sur le terrain mais aussi, augmente l'incertitude relative aux résultats quantitatifs du fait de la grande variabilité dans les conditions d'environnement. Ceci est vrai, surtout en ce qui concerne l'alternance vive eau - morte eau. Pour étudier les variations saisonnières, cette variabilité peut être quelque peu diminuée dans la mesure où les missions sont réalisées dans des conditions de marée équivalentes, par exemple avec une périodicité de quinze jours correspondant à la périodicité du cycle semi-diurne.

L'échantillonnage a été par conséquent planifié de la manière suivante :

Répartition spatiale : afin d'établir les variations spatiales de manière significative, plus particulièrement entre les points côtier et large, les échantillons ont été prélevés aussi près que possible des étales de haute mer ou de basse mer quand le mouvement dû à la marée, et par conséquent l'interférence espace-temps est supposée minimum.

Variations saisonnières : la périodicité des missions a été bimensuelle dans la mesure du possible, ce qui correspond à un pas de temps assez satisfaisant pour suivre l'évolution quantitative des populations planctoniques. Quand les conditions météorologiques ont été défavorables la périodicité a été mensuelle. La principale exigence a été de travailler à un moment déterminé du cycle vive eau - morte eau. La référence choisie pour le définir est le coefficient de marée utilisé dans l'annuaire des marées français. Ce coefficient représente l'importance d'une marée moyenne d'équinoxe de printemps. La référence actuelle étant choisie comme la valeur fixée à 120 pour une marée astronomique maximale (en fait, il a été défini pour les conditions de marée à Brest mais peut être appliqué aux différentes régions où la marée est semi-diurne). Les missions ont été choisies de telle manière que le coefficient de marée soit compris entre 60 et 70 (marée moyenne de morte eau) aussi souvent que possible.

Microdistribution : plusieurs auteurs (CASSIE, 1963) ont montré que le plancton n'est pas distribué uniformément dans l'environnement. Les organismes sont généralement agrégés en essaims ou taches de taille variable (quelques centimètres à quelques mètres) d'où un accroissement de la variabilité dans les estimations quantitatives. La part due à la microdistribution dans les variations d'abondance du plancton a pu cependant être estimée par la méthode d'échantillonnages répétés ou "replicates". Plusieurs échantillons récoltés simultanément ou dans un laps de temps très court permettent d'estimer un intervalle de confiance dans la comparaison des abondances de plancton soit entre deux stations au même point, soit entre deux points. A Flamanville par exemple, et ceci une fois par mois, 5 prélèvements répétés ont été effectués en un point à haute mer et 5 à la basse mer suivante. Ils ont été comparés aux cinq prélèvements répétés effectués en un autre point.

Choix des niveaux d'échantillonnage : les paramètres physico-chimiques et le phytoplancton sont soit mesurés, soit prélevés à des profondeurs déterminées. Dans les régions étudiées la profondeur d'eau est habituellement inférieure à 30 mètres et trois niveaux d'échantillonnage ont été jugés le plus souvent suffisants. Le zooplancton a été récolté en fonction de la structure hydrologique. Dans les zones où le mélange vertical domine, des traits verticaux ont été effectués du fond à la surface, ce qui permet, soit une estimation de l'abondance moyenne dans la colonne d'eau (globalement homogène) par unité de volume (m^3), soit l'estimation du plancton total de la colonne d'eau par unité de surface (m^2). Cette méthode d'intégration sur la verticale permet de comparer pour des régions voisines ou éloignées, leur richesse qualitative et quantitative indépendamment de la bathymétrie des zones étudiées. L'échantillonnage vertical offre lui-aussi l'avantage de minimiser les variations journalières d'abondance dues aux migrations verticales, réduisant le biais possible associé à un échantillonnage effectué à différents moments de la journée (il peut être important même en zones très côtières). Là où la stratification (thermique, haline ou thermohaline) est importante, des traits horizontaux peuvent être effectués à différents niveaux. A Plogoff, région où coexistent des structures homogènes et des structures stratifiées il a été procédé à un échantillonnage mixte associant les traits horizontaux et traits verticaux fond - surface, ceci dans le but de comparer, pour certaines espèces, la valeur d'abondance à un niveau donné et la valeur moyenne estimée dans la colonne d'eau.

Types d'échantillons de zooplancton recueilli : différents types de pêche et procédures d'analyses ont été utilisés pour caractériser le zooplancton selon les variables à étudier : abondance, biomasse, inventaire taxonomique, structure d'âge de la population de quelques espèces. Les catégories d'échantillons récoltés ont été :

- des échantillons pour la biomasse (exprimée sous forme de poids sec de carbone et d'azote organique) conservés congelés après la récolte,
- des échantillons récoltés avec un filet à vide de maille de 200 μm pour le comptage du mésoplancton et éventuellement du macroplancton - conservés au formol,
- des échantillons récoltés avec un filet à vide de maille de 80 μm pour le comptage des stades de développement de quelques espèces de crustacés (copépodes). Ils sont formolés après la pêche,
- des échantillons récoltés au filet fin (80 μm) destinés à l'étude de larves de mollusques. Ils sont conservés dans l'alcool.

RECOLTE DES ECHANTILLONS ET CONSERVATION

Les études que nous avons entreprises ont été menées pendant un certain nombre d'années, en différents lieux géographiques, effectuées par de nombreuses personnes avec des conditions de travail de terrain ou de laboratoire parfois difficiles. Il a été par conséquent nécessaire de standardiser autant que possible les différentes étapes du prélèvement et du dépouillement d'échantillons, et d'établir comme règle que toute introduction de nouvelle technique et méthodologie pour l'étude d'un nouveau problème devra faire l'objet d'une calibration avec la méthode utilisée précédemment. Tous les participants à l'ensemble des travaux ont été tenus de suivre un schéma type de travail "de routine" qui peut paraître en première analyse quelque peu rigide mais qui n'a eu d'autre but que de maintenir une certaine continuité dans les travaux et de permettre ultérieurement une comparaison des résultats obtenus. Ce schéma peut être résumé de la manière suivante :

Feuille de mer : toutes les informations concernant les mesures et les récoltes sont notées sur un ensemble de feuilles de mer (ci-joint un exemple), une feuille de mer est utilisée par station. Chaque feuille porte la référence de la mission et la date.

Heure : toutes les indications sont rapportées à l'heure du méridien de Greenwich (G.M.T.) afin d'éviter les erreurs pouvant s'introduire au moment des changements d'heure légale au cours de l'année. Dans la région correspondant à nos études, l'heure G.M.T. offre l'avantage de ne jamais être différente de plus d'une demi-heure de l'heure solaire locale, qui est la référence ayant la meilleure signification dans les cycles biologiques.

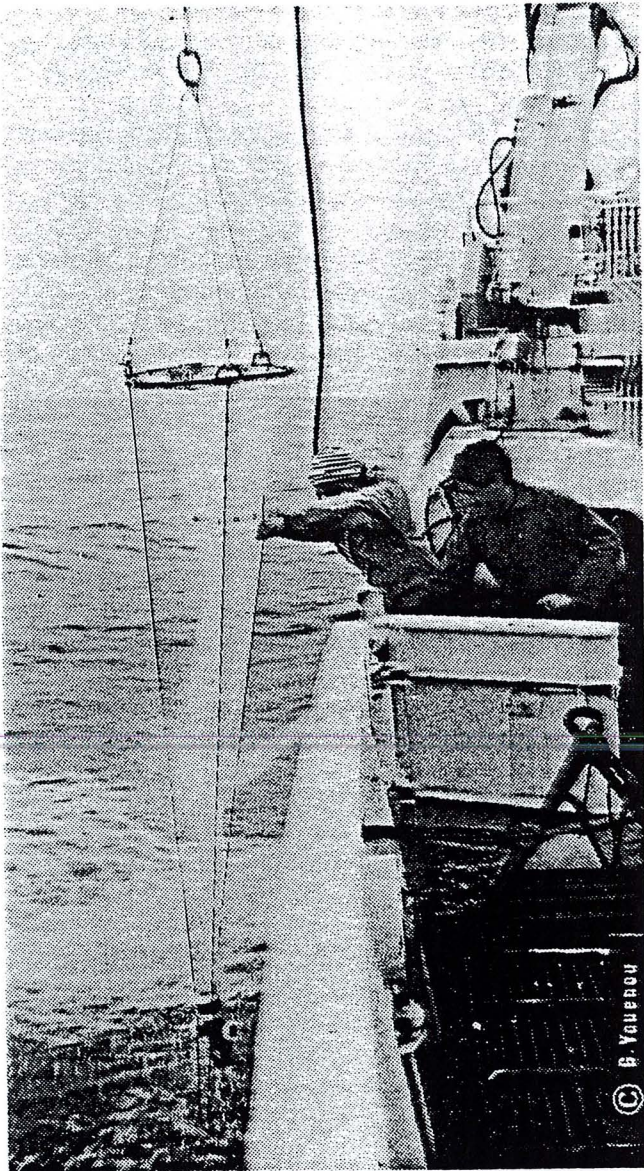
Point : ce terme ne doit pas être confondu avec "station" ; il indique un lieu précis défini par ses coordonnées géographiques et où les travaux de terrain ont été effectués de manière répétitive. Les points sont généralement représentés par une lettre ou un chiffre.

Station : c'est une série complète d'opérations en un point donné. Pour les missions pélagiques une station correspond en général à un ou plusieurs prélèvements hydrologiques et des récoltes de phytoplancton et zooplancton. Elle peut comporter de plus des prélèvements de benthos. Les stations d'une même mission sont généralement numérotées chronologiquement (1 à n). Dans le cas où une étude s'effectue pendant un certain temps, en un point, il peut y avoir plusieurs stations en un point.

Angle du câble : il peut produire un biais dans l'estimation des profondeurs de prélèvements et le calcul de l'abondance pour des traits verticaux. L'angle du câble doit par conséquent être noté, surtout s'il dépasse 30° par rapport à la verticale.

Profondeur sondeur : c'est la profondeur (mètres) entre le capteur de sonde et le fond. Il doit être corrigé, et c'est important dans les zones côtières de la distance entre la surface et la sonde, pour connaître la profondeur d'eau totale.

Profondeur de pêche : pour des traits verticaux de plancton, c'est la distance entre la profondeur du début du trait et la surface. La profondeur initiale du trait est la distance en mètres entre l'ouverture du filet au moment où la pêche commence et la surface. Si le câble est vertical, elle est équivalente à la hauteur d'eau parcourue entre le début du trait et la surface. Si le câble n'est pas vertical, la distance est fonction de l'angle du câble le trait assimilé à un trait oblique. Pour des traits horizontaux, la profondeur de pêche correspond à la profondeur du centre du filet pendant la pêche.



Filet simple WP2.

Le filet est hissé au-dessus du niveau de la mer et rincé abondamment de haut en bas avec une manche à eau.

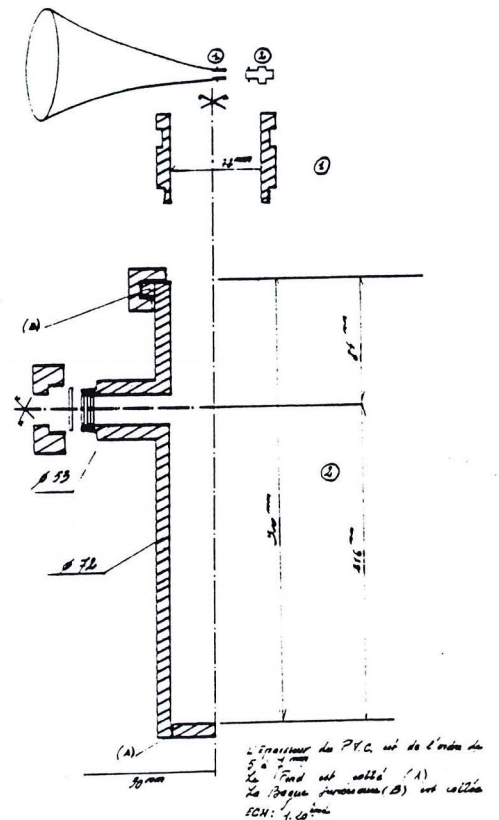


Schéma montrant un collecteur à "oreilles".

Débit-mètre : vérifier que le compteur du débit-mètre est remis à zéro avant l'échantillonnage et lire la valeur à la fin du trait.

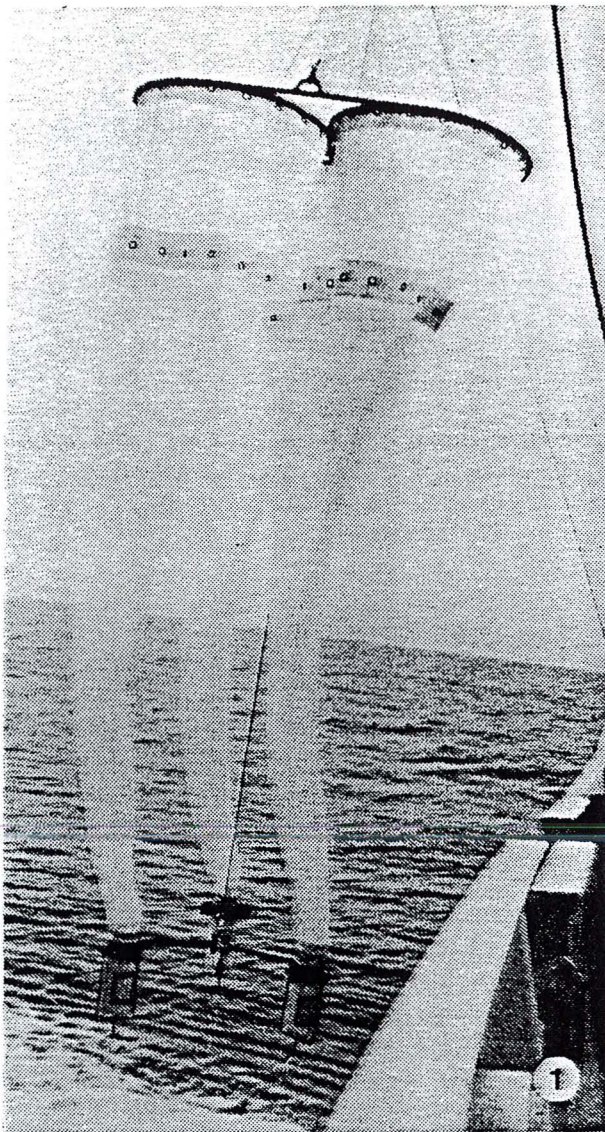
Temps de trait : il est nécessaire de le connaître avec précision en même temps que le nombre de tours du débit-mètre. Un chronomètre est par conséquent utilisé pour mesurer avec précision le temps de trait.

Numérotation des échantillons : chaque échantillon est caractérisé par une référence unique qui doit éviter toute confusion entre deux échantillons. La référence comprend une lettre caractéristique du site suivie d'un chiffre selon une série chronologique (e.g. G.1509 pour le 1509^{ème} échantillon de Gravelines). Il est noté à la fois sur le bocal contenant le prélèvement (avec un marqueur indélébile) et sur la feuille de mer (sur laquelle figurent en même temps l'heure, la date et lieu de prélèvement). Si l'échantillon est trop abondant pour être contenu dans un seul bocal, plusieurs bocaux sont utilisés, numérotés avec le même numéro suivi d'un indice (e.g. G.1509₁, G.1509₂...). Le nombre de bocaux utilisés pour un échantillon donné, doit être noté sur la feuille de mer correspondante pour éviter toute erreur au moment où l'échantillon est dépouillé.

Les types de filets et leur mode d'emploi : pour le mésoplancton et le petit macroplancton (taille variant de 200 μm à 10 mm), le modèle type de filet à plancton adopté est le filet standard WP₂, testé par TRANTER à Sidney en 1966, adopté et décrit selon les normes UNESCO (UNESCO, 1968). Ce filet est un engin quantitatif aisé à manier, très utilisé dans les différentes parties du monde, en particulier sur le plateau continental. C'est un filet cylindroconique dont l'ouverture est de 0.25 m², ce qui correspond à un diamètre interne de 56.4 cm environ pour le cercle en métal galvanisé ou en laiton. Le cercle est relié au câble par une patte d'oie à trois brins métalliques coulissant dans un grand anneau. Le matériel filtrant est un nylon monofilament, tissé selon un maillage dont le vide de maille est 200 μm . Quand le filet a été conçu ses propriétés hydrodynamiques ont été calculées pour obtenir un coefficient de filtration égal à l'unité (i.e. le volume filtré est égal à la valeur du produit de la surface d'ouverture par la longueur du trait dans l'eau) pour une vitesse de remontée ou de remorquage égal à 1 m/seconde et s'il n'y a pas de colmatage. Ces conditions n'ont pas toujours pu être remplies mais l'utilisation de débit-mètre a permis le calcul du volume d'eau filtrée dans tous les cas. Pour que cette méthode soit valable, il est nécessaire de placer le débit-mètre dans une position bien définie, celle où la vitesse de l'eau par rapport au filet est égale à la vitesse moyenne calculée par intégration sur la surface totale d'ouverture. Cette recommandation a été formulée quand le filet a été normalisé (UNESCO, 1968). Le débit-mètre doit être fixé dans le cercle d'ouverture au milieu du rayon, c'est-à-dire à 14.25 cm du cercle. Afin de le maintenir dans le plan du cercle nous utilisons habituellement un système de trois attaches, deux de longueurs fixes et une de type sandow pour un réglage fin.

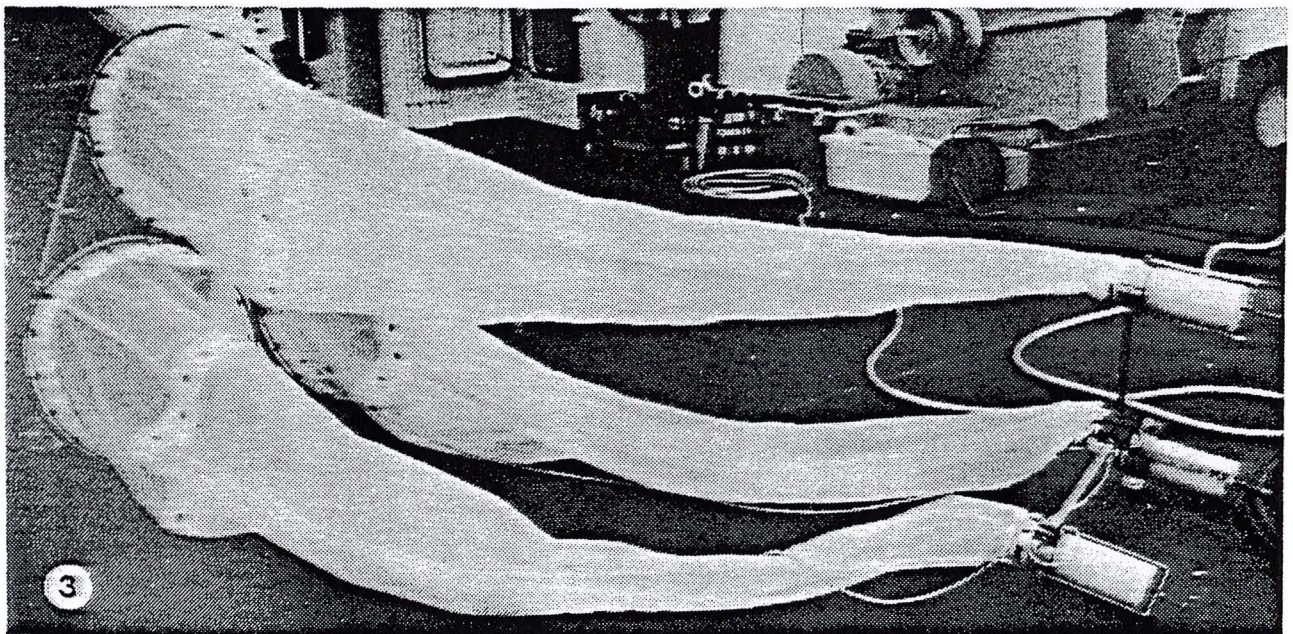
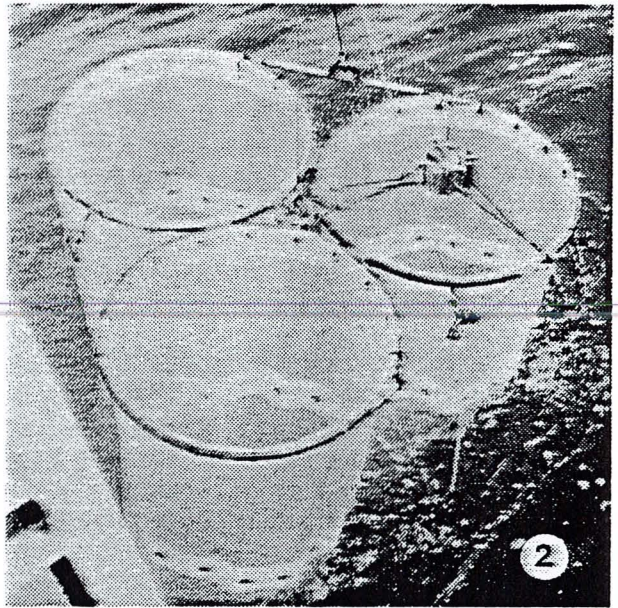
Les organismes plus petits (stades copépodites, larves de mollusques etc.) sont récoltés avec un filet de maille plus petite (80 μm) mais de même forme et avec des caractéristiques identiques à celles du WP₂. Ce filet se colmate plus facilement que le WP₂ type et ses caractéristiques de filtration sont moins bien connues. Dans certaines circonstances (e.g. Bloom phytoplanctonique), les estimations des volumes filtrés peuvent être moins précises et moins correctes.

Les deux filets WP₂ et 80 μm peuvent être utilisés pour des traits verticaux et horizontaux. Le filet peut être utilisé en filet simple ou en filets multiples montés sur une cadre commun.



1) Remontée du filet triple WP2 après un trait vertical.

2) Système d'entrée du filet triple WP2. Un débitmètre TSK est fixé dans l'ouverture d'un filet seulement. Nous considérons que les volumes filtrés sont égaux pour les trois filets.

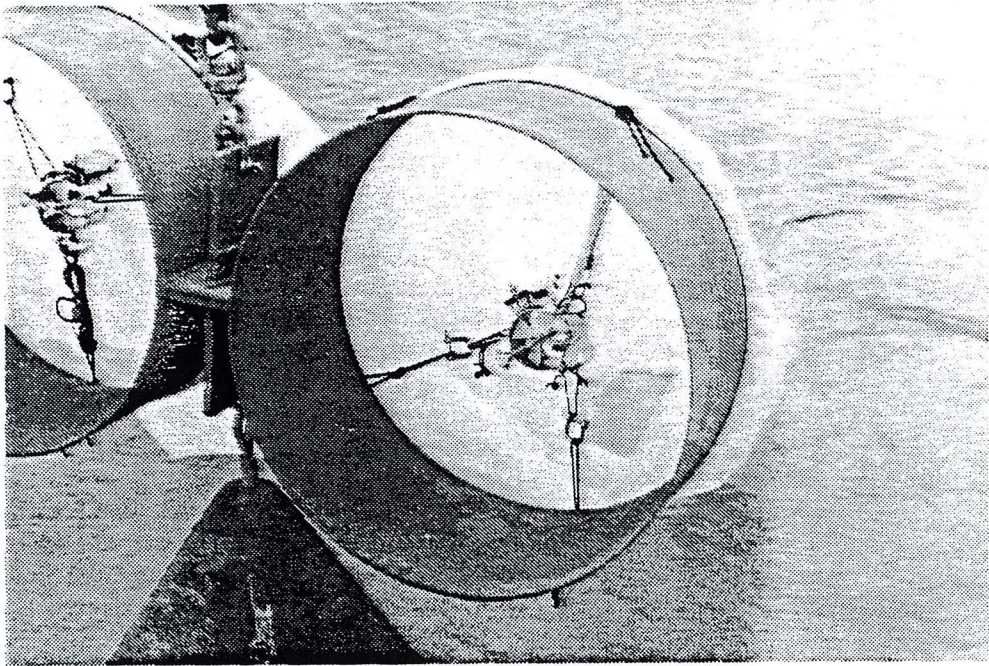


3) Filet triple WP2 posé sur le pont entre deux stations. On aperçoit les deux systèmes supérieurs (trois cercles) et inférieurs (trois collecteurs solidaires de l'étoile) et le câble qui les relie.

Trait vertical, filet simple : les particularités dans l'équipement du filet sont l'utilisation de collecteurs "à oreilles" et celles de trois suspentes mises en place pour éviter que la force de traction ne s'exerce sur le filet lui-même. Les "oreilles" se terminent par deux fenêtres filtrantes circulaires. Elles permettent un écoulement partiel de l'eau avant la collecte de l'échantillon pour éviter ainsi toute perte et par conséquent une erreur quantitative. Les fenêtres sont fermées par des disques constitués du même matériel filtrant que le filet (même vide de maille). Pour une manipulation et un nettoyage faciles ils sont collés sur des cercles de matière plastique de diamètre approprié et tenus en position par des colliers de plastique qui se vissent sur les extrémités des "oreilles". Le collecteur lui-même est vissé par un collier en plastique sur un manchon, attaché à l'extrémité inférieure du filet par un collier métallique. Les suspentes sont attachées à leurs extrémités supérieures au cercle, et attachées ensemble à leurs extrémités inférieures en formant une boucle qui est utilisée pour attacher un poids de 25 kg, 10 à 15 cm en-dessous de l'extrémité du collecteur. Elles sont tenues le long du manchon de l'extrémité inférieure du filet par un second collier en métal. Leurs longueurs entre ce collier et l'ouverture supérieure du filet doivent être réglées légèrement plus courtes que le filet de telle manière qu'elles supportent le poids. Ce réglage des suspentes se fait au moment du gréement du filet, celui-ci étant suspendu verticalement sur un portique.

Trait vertical, filet triple : l'idée de regrouper trois filets identiques dans une même armature a été proposée par le professeur A. BOURDILLON pendant un congrès qui s'est tenu à Roscoff en 1967. Il s'agissait de résoudre le problème suivant, à savoir la nécessité de récolter et de comparer deux types d'échantillons destinés l'un à la mesure de la biomasse, l'autre au comptage des espèces. On ne peut effectuer, le plus souvent, de division par le sous-échantillonnage d'un seul échantillon, à bord, dans de bonnes conditions, ni effectuer un double échantillonnage dans un temps très court, particulièrement en milieu océanique profond. Le filet multiple résout ce problème, de plus un filet triple présente l'avantage d'être mieux équilibré dans l'eau qu'un filet double. Les avantages d'utiliser un filet triple ne se limitent pas à l'échantillonnage en milieu profond. On peut par exemple l'utiliser pour effectuer 3 prélèvements simultanés pour une étude de variabilité sur la même catégorie de prélèvements. On peut également utiliser les trois échantillons pour trois types d'analyses différentes (e.g. : biomasse, comptage et analyse biochimique). Le filet triple est constitué de deux systèmes, un système supérieur d'ouverture et un système inférieur. Le système supérieur d'entrée est formé de trois cercles solidaires. L'ensemble est consolidé par des barres rigides, tangentes extérieurement aux trois cercles et solidaires de ceux-ci. Le système supérieur est attaché au câble du treuil par une patte d'oie à 4 brins. Un seul des trois filets est équipé d'un débit mètre ; on suppose que les deux autres filets filtrent de la même manière. Le système inférieur est constitué d'une étoile à trois branches (alliage inoxydable) à laquelle les bases des collecteurs sont fixées par des colliers de serrage. Cet assemblage rigide permet un maniement plus aisé des collecteurs que dans le cas du filet simple. Les collecteurs sont cylindriques avec une simple fenêtre carrée munie de matériel filtrant, remplaçant les "oreilles" des collecteurs précédemment décrits. Les collecteurs cylindriques glissent sur les manchons d'extrémités des filets et sont maintenus par des colliers à vis dans le système inférieur de l'étoile. Ce système inférieur supporte éga-

© J. Sur

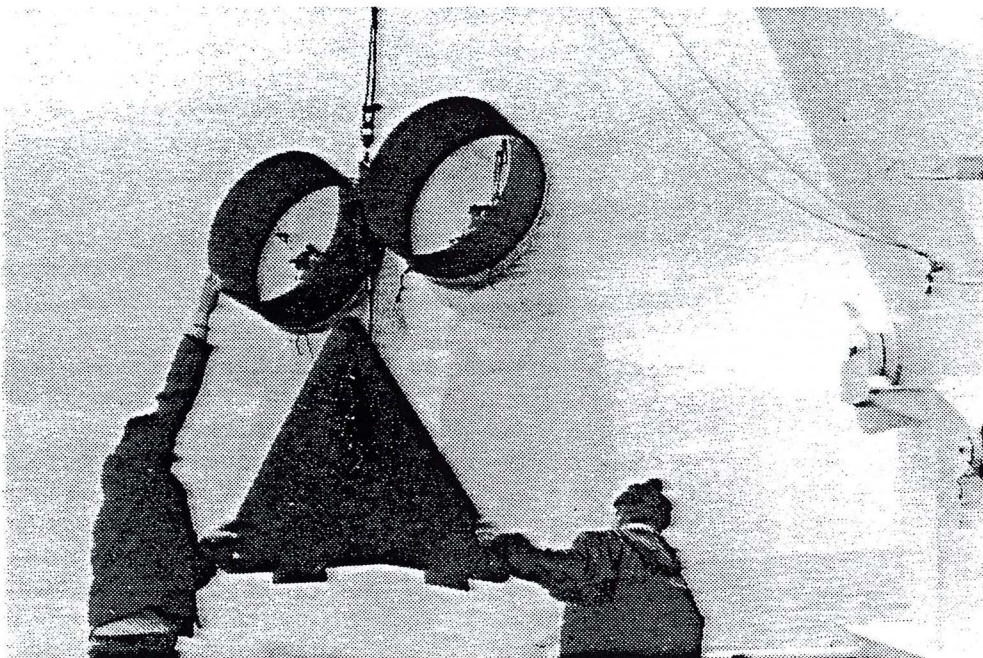


A - Le grand BONGO. Chaque filet est équipé d'un débitmètre TSK.

‡

B - Mise à l'eau du BONGO. Un lourd dépresseur est choisi pour les traits horizontaux. Le poids du dépresseur est choisi en fonction de la vitesse de remorquage prévue.

© J. Sur



lement le poids (par l'intermédiaire d'un mousqueton) sous le centre de l'étoile et est relié au système supérieur d'ouverture des filets par un câble qui a le même rôle que les 3 suspentes du filet simple. Il en résulte que le filet triple est plus volumineux mais il est moins susceptible de se renverser pendant les manipulations. Dans les eaux côtières à fort courant, le maniement du triple est plus aisé, et particulièrement pendant le rinçage en intercalant un émerillon entre le câble de traction et la patte d'oie. Ceci est à déconseiller quand les efforts de traction sont très importants et irréguliers, ce qui est le cas en trait horizontal ou en trait vertical en grande profondeur, ce qui pourrait entraîner une rupture du câble.

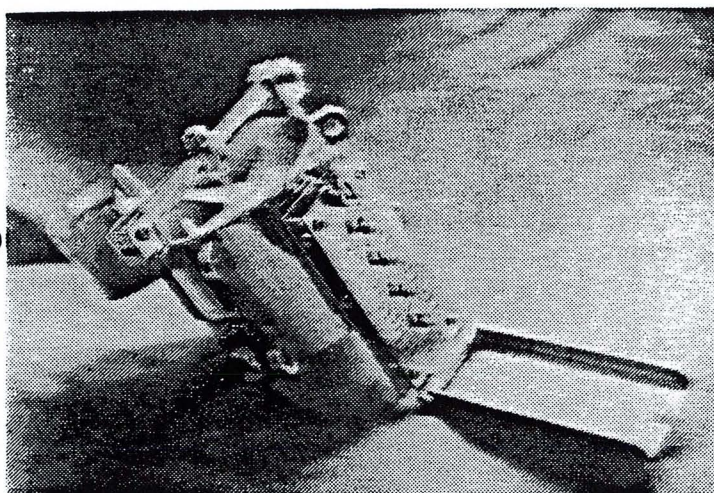
Trait horizontal : on utilise des filets simples. La différence de gréement avec les filets utilisés pour des traits verticaux est que l'on n'utilise ni suspente, ni poids. Parfois un dépresseur est attaché sous le cercle d'ouverture afin de maintenir l'horizontalité du filet, pendant la traction quand la vitesse est assez rapide (plusieurs noeuds).

Macroplancton (i.e. : en particulier les oeufs et les larves) : il est pêché en utilisant une des versions du filet Bongo qui est un filet standard utilisé dans les laboratoires des pêches. Il a été tout d'abord utilisé comme un filet standard des programmes MARMAP et la description originale a été donnée par Mac GOWAN et BROWN (1966). Des modifications ont été ensuite introduites et décrites par SMITH (1974). Cet échantillonneur est utilisé uniquement pour des traits obliques et horizontaux. L'engin est formé de deux tambours reliés par une barre rigide. Deux filets sont fixés sur les tambours desquels ils pendent librement sans structure rigide. Deux versions existent, le grand Bongo (diamètre des tambours : 61 cm) et le petit Bongo (diamètre des tambours : 20 cm). Les deux sont équipés en routine de filets dont les vides de maille sont 505 μm et 333 μm . Pendant nos campagnes, seul le grand Bongo a été utilisé, muni de filets de 475 μm et 315 μm de vide de maille. La taille (et le poids) du depresseur a été choisie en fonction de la vitesse de traction prévue et des conditions météorologiques. Le débit mètre T.S.K. utilisé pour le Bongo est le même que celui du WP₂.

Méthode de pêche : des traits verticaux et horizontaux font tous deux partie de travail mené en station. Le lieu et l'heure sont des références de routine de la station. Quelques caractéristiques de station, par exemple la profondeur d'eau, cependant, peuvent changer rapidement surtout dans les eaux côtières en fonction du cycle de marée ou de la dérive du bateau due aux courants de marée. Nous tenons compte des procédures spécifiques au trait vertical ou horizontal mais dans tous les cas et indépendamment du mode de pêche certaines étapes doivent être suivies :

- lire l'indication du sondeur et le noter,
- mettre le débit mètre à zéro,
- mettre le chronomètre à zéro,
- déclencher le chronomètre au moment où le filet commence à pêcher et lire l'heure (G.M.T.),
- arrêter le chronomètre quand la pêche se termine (moment où l'ouverture du filet sort de l'eau) et noter la durée du trait,
- soulever l'engin suffisamment au-dessus de l'eau afin que les filets soient copieusement rincés du haut en bas avec une manche à eau pour entraîner tout le plancton dans le(s) collecteur(s),
- amener le ou les filet(s) sur le pont en maintenant le ou les collecteur(s) en position verticale,

© G. Le Faure - Lehigh-Fl



Débitmètre TSK.

Quatre aiguilles indiquent le nombre de tours de l'hélice (unités, dizaines, centaines, milliers).

Appareil de filtration MILLIPORE.

(Photo extraite du catalogue Millipore).



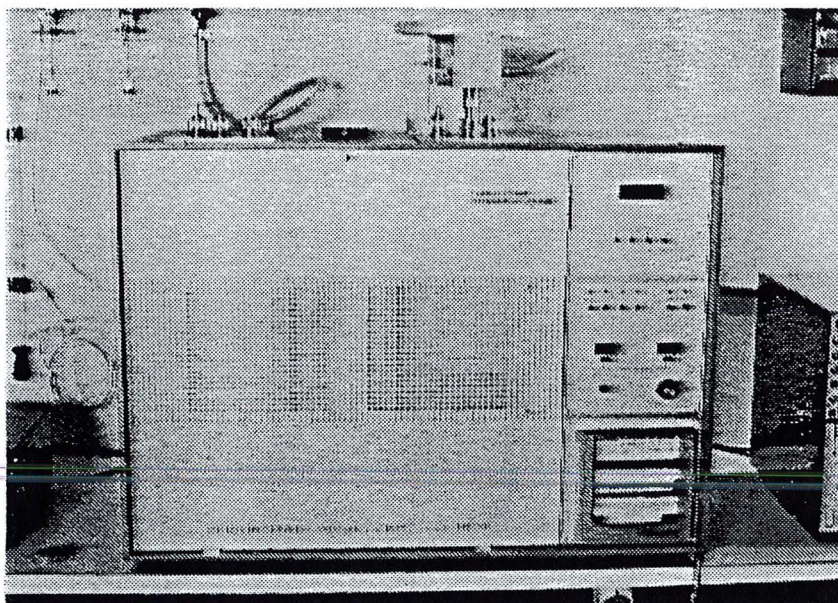
- lire le débit mètre et noter le nombre de tours,
- pencher les collecteurs pour concentrer le plancton, rincer les fenêtres filtrantes avec soin une ou plusieurs fois pour être certain de recueillir tout le plancton,
- transférer les échantillons des collecteurs dans les bocaux. A cette étape, le rinçage des collecteurs et des fenêtres ou oreilles des collecteurs est nécessaire une ou plusieurs fois encore. Les échantillons de biomasses sont filtrés immédiatement (à partir du collecteur ou du bocal). Les autres échantillons sont conservés dans les bocaux, le plus souvent, par addition de formol (30 % - 40 % de formaldéhyde) égal à 10 % environ du volume de l'échantillon (pour donner une concentration finale de 3 % - 4 % environ). Dans d'autres cas, les échantillons peuvent être conservés avec de l'éthanol 70 % par exemple,
- noter les références de l'échantillon (lettre, nombre, numéro de série de la soie utilisée pour la filtration de la biomasse).
- rincer abondamment le(s) filet(s) et le(s) collecteur(s). De cette manière les étapes décrites ci-dessus garantissent normalement un échantillonnage quantitatif satisfaisant, et évite le plus possible des erreurs de contamination entre échantillons récoltés successivement,
- remettre en place les collecteurs sur les filets, ramener le débit mètre à zéro et le chronomètre à zéro ; ainsi, le matériel est prêt pour la nouvelle station.

Pour un trait vertical (WP₂ ou filet 80 µm) la poulie compteuse est mise à zéro quand le cercle d'ouverture est descendu et affleure la surface de l'eau. Le filet est descendu jusqu'à 2-3 m au-dessus du fond (longueur du filet). Puis, la remontée du filet doit se faire à vitesse constante (1 ms⁻¹) comme le recommande l'UNESCO (1968). Il est essentiel de ne pas effectuer d'arrêt pendant la remontée pour éviter une perte de récolte. Si cela arrivait, par hasard, il faudrait jeter l'échantillon et recommencer entièrement au début. Les traits horizontaux se font en général en utilisant une force de traction de 1.5 à 2 noeuds pour le WP₂ et 2-3 noeuds pour le Bongo. Il est important de maintenir la vitesse de trait aussi constante que possible. Autrement, des changements dans la profondeur de pêche et une perte de pêche pourrait se produire. Les poids et les dépresseurs doivent être calculés en fonction des conditions de travail.

Stockage des échantillons : aucune procédure spéciale n'est exigée pour stocker les échantillons dans le formol ou dans l'alcool. Les échantillons de biomasses sont stockés dans des congélateurs portatifs qui peuvent fonctionner sur 220 volts C.A. ou 12 volts C.C. Ainsi les congélateurs peuvent-ils être en marche, sans arrêt depuis le bateau jusqu'au laboratoire, même pendant un transport par route.

METHODES UTILISEES AU LABORATOIRE

Les données sont obtenues sous des formes variées depuis les biomasses en poids sec, la composition en carbone et azote organique, le nombre d'individus ; pour différentes catégories de taille d'organismes correspondant aux différents filets utilisés. Toutes ces données quantitatives sont exprimées relativement à un volume ou une surface donnée qui exige la connaissance du volume d'eau filtré. Les débit-mètres utilisés sont de type T.S.K. (Tsurumi - Seiki - Kosakusho) muni d'un certificat d'étalonnage. La formule donnée dans le certificat d'étalonnage comprend un nombre de tours de l'hélice par seconde et



Analyseur CHN CARLO ERBA modèle 1106 muni d'un échantillonneur pour 50 échantillons.



Intégrateur DP 110.

une constante. Pour une estimation du volume, il faut faire intervenir le temps de trait et l'aire de l'ouverture du filet. La formule finale peut être résumée ainsi :

$$V = S (aN + kt) \text{ où :}$$

V est le volume d'eau filtrée (m^3)

S est la surface d'ouverture (m^2) : ex. : $0.25 m^2$ pour WP₂

N est le nombre de tours

t est le temps de trait (secondes)

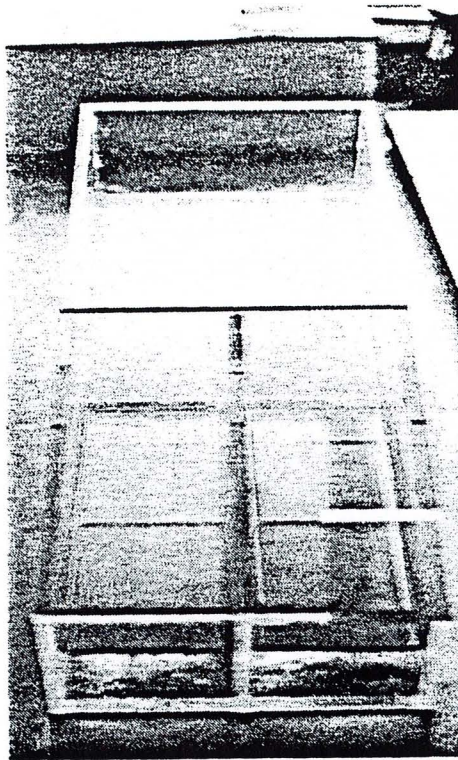
a est un facteur de proportionnalité donné dans le certificat

k est une constante du même certificat

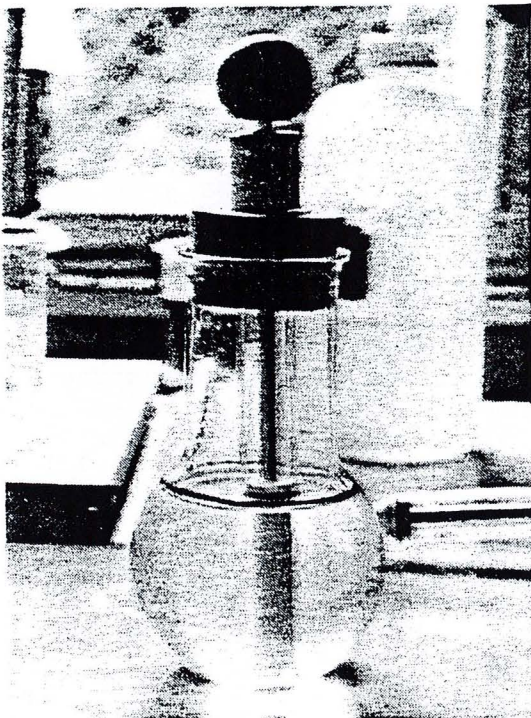
Données quantitatives globales : elles comprennent le poids sec (biomasses), la matière organique totale, la composition en carbone et azote organiques. Toutes ces variables sont obtenues par le même type de filet (le plus souvent 200 μm) que celui utilisé pour la récolte de l'échantillon destiné au comptage des individus des différentes catégories taxonomiques. L'échantillon est filtré à bord sur un filtre en nylon prépesé et numéroté. Pour éviter toute perte de plancton le filtre est souvent d'une maille plus fine que le filet (100 μm pour une récolte avec un filet 200 μm) mais la sélectivité de l'échantillon est celle du filet et non du filtre, quand il est plus fin. Comme il a été mentionné ci-dessus, le filtre et sa charge en plancton sont immédiatement congelés à bord et gardés congelés jusqu'aux mesures de laboratoire. Elles comprennent plusieurs étapes qui fournissent des expressions différentes du plancton total. Selon le programme et les conditions de la mission seulement quelques-uns des paramètres ont été mesurés. La première étape des mesures est la mesure du poids sec et a été obtenue dans tous les cas. Dans les zones où la matière particulaire en suspension est très abondante, il peut arriver qu'une importante fraction minérale puisse entraîner un biais dans l'estimation du poids sec. Dans ce cas, il est souhaitable de connaître la matière organique totale dans le poids sec. Le carbone et l'azote organiques sont utiles pour l'étude des transferts le long des chaînes trophiques. Ils ne peuvent être estimés dans le même échantillon que la matière organique totale. Il est par conséquent souhaitable de faire les mesures sur plusieurs échantillons ou sur des fractions d'un seul échantillon. Dans le dernier cas, la valeur du poids sec est utilisée comme référence pour calculer à la fois la matière organique totale et le carbone et l'azote organiques.

Poids sec : l'échantillon congelé est séché à 60°C pendant 48 heures, refroidi et pesé avec une précision de ± 0.1 mg avec une balance Mettler. Le poids du filtre en nylon est soustrait pour obtenir la valeur du poids sec.

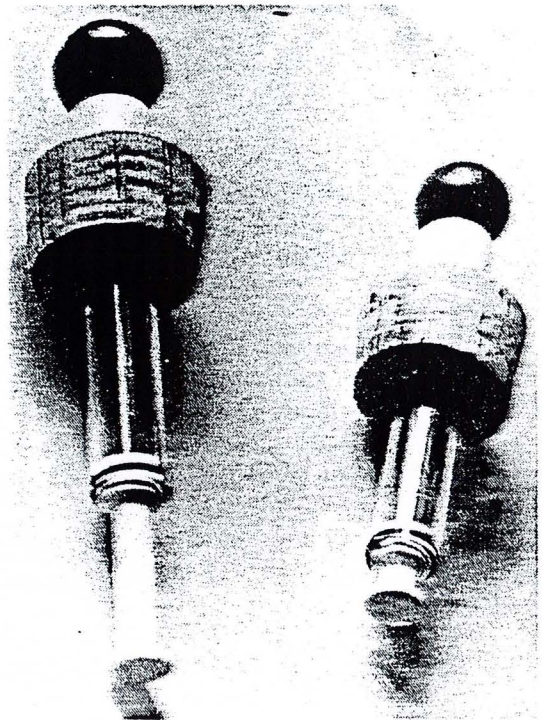
Matière organique totale : après la mesure du poids sec, le contenu de matière sèche contenue sur le filtre est récupéré par grattage du filtre et déposé dans un creuset. Toute la biomasse sèche n'est pas retrouvée, une petite fraction étant restée sur le filtre. Une pesée doit permettre de connaître la quantité exacte de matière sèche contenue dans le creuset. Cette quantité est utilisée soit en totalité, soit en partie pour l'estimation de la matière organique. La matière sèche dans le creuset est brûlée dans un four dont la température s'accroît par palier pendant 24 heures jusqu'à 550°C. Le four est ensuite maintenu à cette température pendant 48 heures et refroidi par palier pendant 48 heures. Le poids de la matière organique est la différence entre le poids de matière sèche initiale et le poids de cendres final.



Boite de MOTODA.



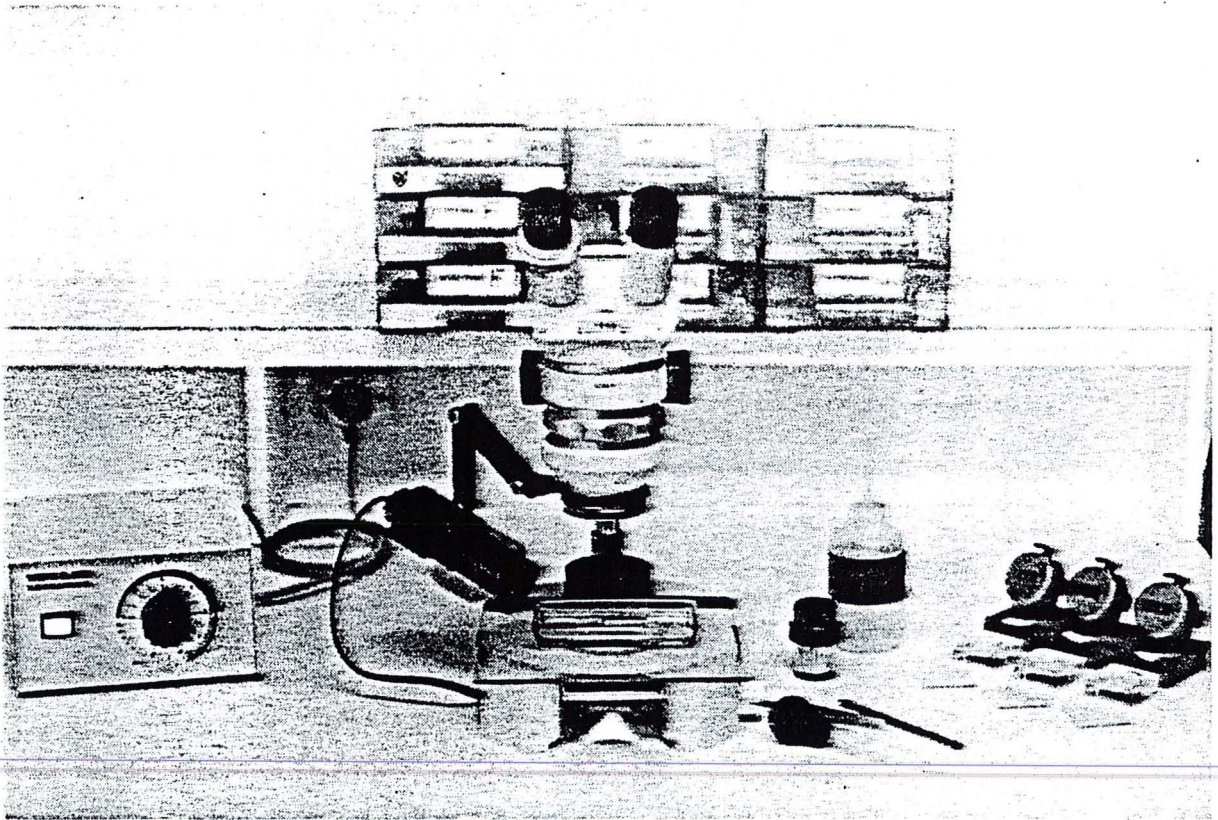
Pipette de Stempel dans un ballon jaugé (250 ml).



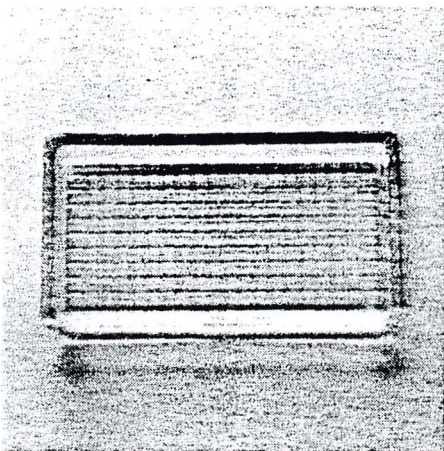
Deux pipettes de Stempel de 5 ml et de 1 ml.

Carbone organique et azote organique : ils sont obtenus à partir d'un poids sec connu de plancton par l'utilisation d'un analyseur C.H.N. Ce type d'appareil permet d'analyser de très petite quantité de matière sèche. L'échantillon est préalablement homogénéisé par broyage et une petite quantité de celui-ci est pesée avec une microbalance. Cette fraction est oxydée par combustion à haute température (environ 1000°C) en utilisant un catalyseur. Les gaz résultant sont ensuite réduits à température plus basse (400°C à 700°C), puis séparés (N₂, CO₂, H₂O) sur une colonne à chromatographie à une température encore plus faible (100°C ± 10°C). Ils sont enfin détectés par un système sensible aux variations de conductivité thermique, le signal est enregistré et est visualisé sous forme de pics. Les valeurs obtenues sont proportionnelles à l'aire sous les pics et sont automatiquement calculées par un intégrateur. Les résultats obtenus sont cependant relatifs et doivent être calibrés par l'analyse d'échantillons de références constitués d'une quantité précise de substance organique pur et de composition élémentaire connue (i.e. acétanilide). Deux types d'analyseurs ont été utilisés, un Hewlett Packard modèle 185 B avant 1984 et un Carlo-Erba modèle 1106 après. Les deux utilisent un flux de gaz inerte (hélium) à travers le circuit d'analyses mais ils diffèrent par un certain nombre de détails techniques. Dans l'analyseur Hewlett-Packard par exemple, les échantillons sont déposés dans des nacelles d'aluminium avec le catalyseur (MnO). Dans l'analyseur Carlo Erba, les échantillons sont introduits dans des capsules de métal oxydable (étain) qui sont brûlés avec leur contenu. Le catalyseur est différent (Cr₂O₃) et est contenu dans une partie du circuit d'analyse où les gaz chauds sont entraînés. Dans les deux appareils, des échantillons standard ont été analysés mais aussi des blancs par exemple dans le Hewlett Packard deux ou trois analyses de Nacelles contenant uniquement le catalyseur permet de vérifier qu'il ne contient pas d'azote ou une quantité infime. Pour le Carlo-Erba, parfois utilisé pour doser le phytoplancton sur filtre en fibre de verre une vérification dans le même souci peut-être faite en analysant une partie de filtre seul. Dans tous les cas des précautions rigoureuses doivent être prises pour éviter toute contamination des échantillons par un apport extérieur de matière organique. Ainsi, il est nécessaire de nettoyer les nacelles d'aluminium préalablement aux pesées avec de l'éthanol et de les stocker avant usage dans un four à 400°C. Des mesures identiques doivent être prises avec chaque instrument (spatules, pinces) nécessaire aux manipulations des échantillons qui ne doivent jamais venir en contact avec les mains. Ne pas fumer est, bien entendu, absolument indispensable.

Analyse taxonomique : elle consiste dans l'examen de l'échantillon ou d'une partie de l'échantillon sous loupe binoculaire (ou stéréomicroscope) pour identifier les catégories taxonomiques (les espèces si cela est possible dans chaque catégorie). Ce travail est fait sur les échantillons formolés, récoltés avec des filets différents (80 µm, 200 µm, 315 µm, 515 µm). Avant que cette analyse soit entreprise (de quelques jours à plusieurs mois après la récolte), l'examen des échantillons à l'oeil nu, à bord même, peut parfois apporter des informations avec possibilité éventuelle de modifier une stratégie d'échantillonnage au cours d'une mission en tenant compte des résultats. Ceci peut se faire à bord, par un spécialiste entraîné. Ce n'est pas fréquent. On peut aussi envisager un examen immédiat des échantillons avec une loupe à bord mais cela n'a pas été possible dans les missions décrites ici, effectuées sur des petits bateaux parfois sans laboratoire suffisant mais surtout sans stabilité suffisante pour ces travaux.



Loupe binoculaire (ou stéréomicroscope) WILD M5.



Cuve de DOLLFUS.
Elle comporte 200 carrés
de 5 mm de côté.

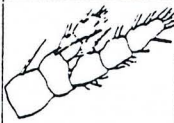
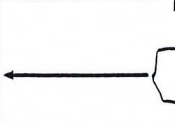

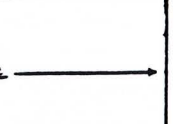

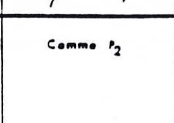

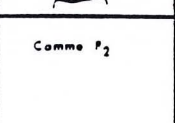

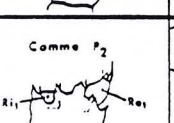

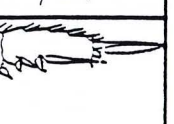
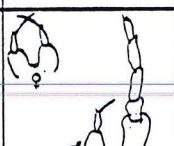
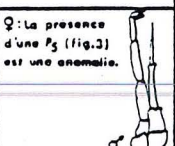
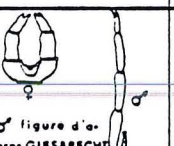
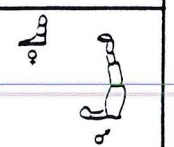
Sous-échantillonnage : la taille du prélèvement varie selon l'endroit et le moment. La plupart des échantillons sont trop abondants pour que tous les individus soient comptés. Il est par conséquent nécessaire de faire des sous-échantillons correspondant à une fraction connue de l'échantillon total. Différentes techniques sont utilisées pour cela entre lesquelles le choix dépend des caractéristiques de l'étude en cours. Le sous-échantillonnage peut être évité si l'abondance est rapportée à une échelle "subjective" (cf. FRONTIER, 1969). Ceci aide considérablement l'analyse alors plus rapide, mais ce procédé est surtout valable si tous les échantillons peuvent être comparés par un même spécialiste. Mais, dans la mesure où les études décrites ici s'étendent sur un grand nombre d'années, concernent plusieurs zones géographiques et pour lesquelles les comptages sont effectués par plusieurs personnes il a semblé nécessaire d'utiliser une méthode de comptage "standard" qui utilise des méthodes de sous-échantillonnages simples, comme la boîte de Motoda, le Folsom splitter et la pipette de Stempel.

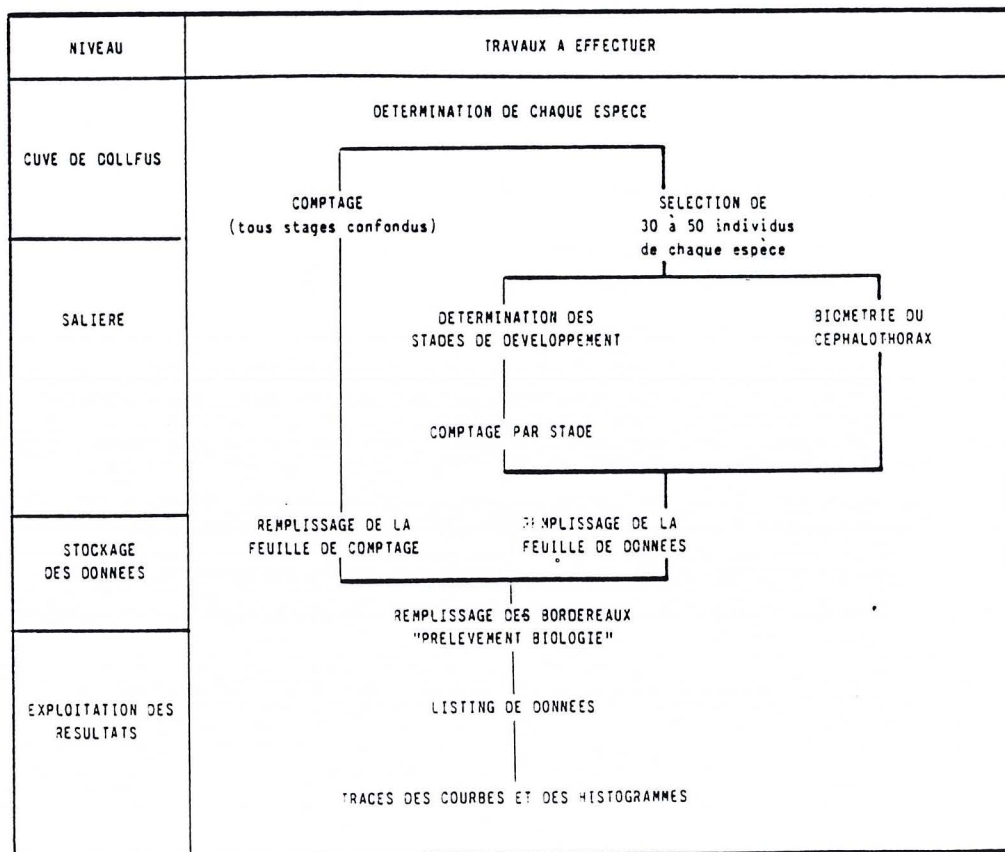
La boîte de Motoda et le Folsom splitter divisent tous les deux l'échantillon en deux moitiés. Une des deux moitiés peut, à son tour, être divisée en deux et ainsi de suite jusqu'à "n" divisions, et un sous-échantillonnage de 2^n . Le principal inconvénient est que la division n'étant jamais parfaite, chaque division entraîne une erreur qui va croître exponentiellement. La technique est cependant acceptable pour les petits échantillons qui seront, par conséquent, peu divisés. Ceci a été assez souvent le cas dans nos études, puisque un trait vertical dans les eaux côtières correspond souvent à un volume d'eau filtrée variant de 2 à 10 m³ et ne requiert pas un facteur élevé de sous-échantillonnage.

Pour l'utilisation de la pipette de Stempel, l'échantillon est d'abord dilué dans un volume connu d'un flacon. La pipette (qui est en fait une seringue à piston), est ensuite utilisée pour prélever une fraction de volume déterminé (1 ml, 5 ml ...), après avoir homogénéisé le plancton en suspension. La seringue de 5 ml est couramment employée, ce qui donne un fractionnement de 1/50 quand l'échantillon a été ajusté à 250 ml. On peut répéter la même procédure plusieurs fois (en additionnant des fractions élémentaires). Mais le procédé devient long et peu pratique. La pipette de Stempel a été utilisée pendant nos travaux, essentiellement pour prélever, en une seule fois, une très petite fraction d'un échantillon très abondant. Ceci a été le cas pour faciliter le comptage des noctiluques (dinoflagellés) à Gravelines quand les abondances atteignent, en été par exemple, 10³ individus/m³.

Comptage : la fraction à compter est placée dans une cuve de Dollfus, qui est une cuvette en verre rectangulaire dont le fond est divisé en 200 carrés (10 lignes, 20 colonnes), les carrés ont 5 mm de côté et ont des bords en relief. Ces caractéristiques permettent aux organismes d'être repérés dans un carré donné de la cuvette. Le comptage se fait facilement en examinant les carrés ligne après ligne, ou colonne après colonne, toujours dans un ordre fixé au début du comptage. La fourchette de confiance pour les erreurs de sous-échantillonnages devient plus étroite quand le nombre d'individus comptés pour une espèce donnée augmente. Un compromis doit être cependant trouvé entre la nécessité de faire des estimations précises, ce qui demande le comptage de nombreux individus et le temps qu'il est indispensable de fournir pour ce comptage. FRONTIER (1972) a montré qu'un compromis raisonnable était trouvé quand 100 individus étaient comptés pour une

Clé de détermination des Para-Pseudocalanidae communs en Manche et Atlantique. Les critères morphologiques utilisés sont les pattes natatoires. (D'après Le Fèvre J. 1971).

	Paracalanus parvus	Pseudocalanus elongatus	Clausocalanus sp.	Ctenocalanus vanus
P ₁				
P ₂	Re ₃  B ₂ 	Re ₃  B ₂ 	Re ₃  B ₂ 	Re ₃  B ₂ 
P ₃	Re ₃ Comme P ₂	Re ₃ Comme P ₂	Re ₃ Comme P ₂	Re ₃ Comme P ₂
P ₄	Re ₃ Comme P ₂ & P ₃	Re ₃ Comme P ₂ & P ₃	Re ₃ Comme P ₂ & P ₃	Re ₃ Comme P ₃
P ₅		♀: La présence d'une P ₅ (fig.3) est une anomalie. 	♂ figure d'après GIESBRECHT 	

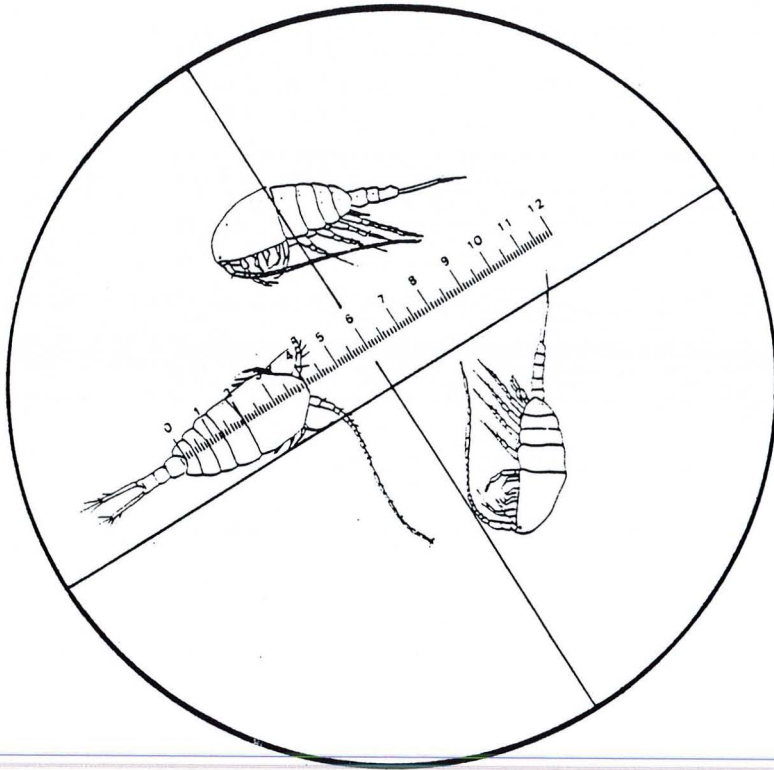


catégorie taxonomique donnée. Le sous-échantillon nécessaire à ce comptage est par conséquent d'autant plus petit que l'espèce est plus abondante. Les sous-échantillons les plus petits doivent donc être comptés les premiers, puis les sous-échantillons de plus en plus grands. Le comptage peut être fait, pas à pas, jusqu'à ce que le seuil pour chaque taxon soit atteint, les espèces rares étant comptées dans l'échantillon total. Cette procédure scrupuleusement suivie demande encore trop de temps dans le cas de nos missions où un très grand nombre d'échantillons doit être exploité dans un temps déterminé et limité. Les espèces les plus abondantes, celles de plus grand intérêt écologique, sont par conséquent comptées en appliquant strictement la méthode de FRONTIER, les autres espèces dans des fractions variables ($1/2$, $1/4$, $1/8$...). L'échantillon total est examiné à l'oeil nu et au binoculaire, mais rapidement pour repérer et compter les individus rares mais de grande taille : Mysidacés, larves de Poissons, Chaetognathes, qui représentent une large biomasse ou apporte une information quantitative supplémentaire. Le désavantage de cette méthode est que les espèces rares et très petites peuvent ne pas être vues. Quand elles sont repérées cependant en nombre très faible dans un grand échantillon, l'estimation quantitative est mauvaise et il est parfois préférable de donner les résultats sous forme de présence et absence (+, -). Pour les organismes dont l'estimation quantitative est possible, le nombre dans l'échantillon est obtenu en multipliant le nombre compté par le facteur de fractionnement et le résultat est ensuite donné en unité de volume ou de surface.

De temps en temps, on trouve dans la cuvette de comptage des individus qui ne peuvent être identifiés immédiatement. Ces individus sont prélevés et mis de côté pour les déterminer après le comptage ; ensuite ils sont examinés au microscope et disséqués si nécessaire en utilisant des clefs de détermination. Un problème particulier a été posé, par exemple, pour la détermination des copépodes des familles Paracalanidae et Pseudocalanidae qui sont toujours très abondants dans les échantillons dont les espèces (i.e. Paracalanus parvus, Pseudocalanus minutus, Ctenocalanus vanus et Clausocalanus sp. dans la région considérée et les deux premiers vraiment très communs) sont presque impossible à distinguer sous loupe binoculaire (sauf pour un spécialiste très entraîné à ce type de détermination). Leur identification est un travail long et fastidieux qui ne peut concerner tous les individus. Cependant, on peut obtenir quelques informations compte tenu de l'abondance de certaines espèces qui ont des caractéristiques écologiques différentes, et pour lesquelles le comptage de la somme totale n'a pas de sens. Le groupe Para-Pseudocalanidae est identifié selon les critères décrits par J. LE FEVRE (1971). Dans un premier temps, l'ensemble des espèces est compté comme un taxon dans un comptage de routine. Les 30 ou 40 premiers individus sont prélevés dans l'ordre où ils sont rencontrés sans sélection, sont examinés au microscope puis déterminés grâce aux critères morphologiques des pattes natatoires. Les espèces, les sexes et leur stade de maturité (femelles ovigères) sont distingués. Dans l'ensemble du comptage de l'échantillon tous les organismes ne sont pas déterminés au niveau de l'espèce mais parfois au niveau du genre ou même de la famille ou groupe ; ce niveau de détermination d'un individu n'est pas toujours fonction de son importance dans l'écosystème. Malheureusement, force est de constater qu'un individu peut être déterminé avec peu de précision pour la seule raison de la difficulté et du temps de travail. Il peut y avoir un compromis entre qualité de l'information fournie et du temps exigé pour l'obtenir.







Etude de la dynamique de population des copépodes : elle utilise les échantillons récoltés au filet de 80 μm (vide de maille). Trois espèces considérées comme importantes sont étudiées : Temora longicornis, Centropages hamatus et Acartia clausi. Comme pour le comptage taxonomique les échantillons

Biométrie du
cephalothorax de
Temora longicornis
vu dans le plan
longitudinal, face
dorsale.



 unité micrométrique

Stades de développement de 3 espèces de Copépodes : *Temora longicornis*, *Centropages hamatus*, *Acartia clausi*.

Stade	Nombre de paires de pattes	Nombre de segments abdominaux	Critères de sélection	Remarques	Développement		
					Exemple <i>Temora longicornis</i>		Descriptif
					Abdomen ♀	P ₅ ♂	
1 2 3	2 3 4	2 2 2	a) nombre de paires de pattes b) nombre de segments thoraciques			- Sexes non distingués - Tous les appendices de la région céphalique sont présents. - développement du thorax par mues successives avec une nouvelle paire de pattes à chaque fois.	
4♀ 4♂	5 5	3 3	a) nombre de segments abdominaux. b) stade de maturité du segment génital ♀ (1er segment abdominal).	♀ segment génital peu renflé. ♂ légère dissymétrie de la P5	 	♀ et ♂ - les sexes sont distinguables. ♀ début du renflement du génital. ♂ apparition de la dissymétrie de la P5 droite.	
5♀ 5♂	5 5	3 4	c) différenciation morphologique de la P5 ♂ et de la A1 ♂ (A1 droite).	♀ segment génital renflé ♂ Dissymétrie de la P5 marquée.	 	Les caractères adultes s'accroissent.	
Adulte ♀ Adulte ♂	5 5	3 4		♀ segment génital très renflé. ♂ P5 complètes. ♀ et ♂ état définitif de l'individu.	 	♀ segment génital très renflé. ♂ dissymétrie très nette de la P5 et de l'A1 (droites). ♀ et ♂ - l'individu a terminé sa croissance.	

in SARS (1903) - KRAEFFT (1910) - GAUDY (1962)

- Légende : ♀ = femelle ♂ = mâle

A₁ = première antenne

P₅ = 5ème patte

sont vus sous loupe binoculaire, dans une cuve de Dollfus. Les 30 ou 40 individus de chaque espèce sont comptés par stade (copépodites et adultes) et leur céphalothorax est mesuré, en utilisant un micromètre oculaire. Les résultats sont extrapolés à tous les individus de la population de l'échantillon de la même façon que pour l'analyse taxonomique des Para-Pseudocalanidae. Ce travail fournit des données qui peuvent servir aux études de dynamique de population depuis l'analyse des variations dans le temps de la structure de la population d'une espèce donnée, la reconnaissance des générations ou cohortes, leur temps de renouvellement, l'influence des facteurs d'environnement sur la taille et la durée de l'intermue, ceci dépend de la qualité des données et de la fréquence des prélèvements.

Traitement des données et stockage : toutes les données (biomasses, composition élémentaire et spécifique, stades comptés) sont exprimées par unité de volume ou par unité de surface (pour des traits verticaux). La référence de l'unité de volume est 10 m^3 pour une analyse taxonomique (pour éviter des nombres fractionnaires pour les espèces rares) et le m^3 pour les autres types de données. On utilise les formules suivantes pour un taxon compté :

$$N_v = n_i \times f_i \times 10/V$$

$$N_s = n_i \times f_i \times h/V$$

où N_v est le nombre d'individus par unité de volume (10 m^3)

N_s est le nombre d'individus par unité de surface (m^2)

n_i est le nombre d'individus comptés pour le taxon i

f_i est le fractionnement correspondant

V est le volume filtré (m^3) calculé comme il a été indiqué précédemment

h est la hauteur de la colonne d'eau (sonde, m)

Les données sont enregistrées sous une forme normalisée, pour être stockées et exploitées par ordinateur afin de fournir des tableaux, des figures ... Les données taxonomiques sont entrées dans un certain ordre, sous forme de code alphanumérique faisant référence au genre et à l'espèce (e.g. TEMO LON pour Temora longicornis) et ceci pour les comptages spécifiques où tous les stades sont confondus. Le code est modifié pour archiver les données de dynamique de population (e.g. TEMO 002 pour le stade copépodite 2 de Temora longicornis) et l'espace prévu permet de noter la longueur du céphalothorax correspondante. Les graphes et les histogrammes peuvent être obtenus automatiquement et tracés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOUGIS P., 1974 - Ecologie du Plancton Marin. Vol. 2 : Le Zooplancton. Masson et Cie, Paris, 200 p.
- CASSIE R.M., 1963 - An experimental study of factors inducing aggregation in marine plankton. New Zealand Journal of Science, 2, 339-365.
- FRONTIER S., 1969 - Sur une méthode d'analyse faunistique rapide du zooplancton. Journal of experimental marine Biology and Ecology, 3, 18-36.

- FRONTIER S., 1972 - Calcul de l'erreur sur un comptage de zooplancton. Journal of experimental marine Biology and Ecology, 8, 121-132.
- GAUDY R., 1962 - Biologie des copépodes pélagiques du golfe de Marseille. Recueil des Travaux de la Station marine d'Endoume, 27, 93-184.
- KRAEFFT F., 1910 - Uber das Plankton in Ost- and Nordsee und den Verbindungsgebieten, mit Berücksichtigung der Copepoden. Wissenschaftlich Meeresuntersuchungen Abteilung Kiel, 11, 29-99.
- LE FEVRE J., 1971 - Evaluation des caractéristiques d'emploi d'un échantillonneur de plancton haute vitesse, suivie d'exemples d'application à l'étude du zooplancton de la pointe de Bretagne. Thèse de Doctorat de Spécialité (Océanographie Biologique), Université de Paris 6, 179 p.
- Mac GOWAN J.A. & BROWN D.M., 1966 - A new opening closing paired zooplankton net. Scripps Institution of Oceanography, Reference Series, 66-23, 56 p.
- OMORI M. & IKEDA T., 1984 - Methods in Marine Zooplankton Ecology. John Wiley and Sons, New-York, 331 p.
- SMITH P. & RICHARDSON S.L., 1977 - Standard techniques for fish egg and larvae surveys. FAO Fisheries technical Papers, 175, 100 p.
- SARS G.O., 1903 - An account of the Crustacea of Norway. Vol. 4 : Copepoda Calanoida. The Bergen Museum, Bergen, 171 p., 108 pl.
- UNESCO, 1968 - Zooplankton sampling. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology, 2, UNESCO Press, Paris, 174 p.

C H A P I T R E V

BENTHOS SUBTIDAL ET INTERTIDAL

Jean-Marie DEWARUMÉZ

Station Marine de Wimereux

SOMMAIRE

	Page
I - LES PRELEVEMENTS	1
I.1. Travail à la mer - benthos subtidal	1
I.1.1. Localisation des stations	1
I.1.2. Techniques de prélèvement	1
I.1.2.1. Prélèvements quantitatifs	1
I.1.2.2. Prélèvements qualitatifs	4
I.2. Travail sur le terrain - Benthos intertidal	4
I.2.1. Localisation des radiales et des stations	4
I.2.2. Prélèvement	6
II - LE TRAVAIL AU LABORATOIRE	6
II.1 Analyse granulométrique	6
II.1.1. Traitement de l'échantillon	6
II.1.2. Expression des résultats	10
II.2.2. Principe des analyses cénotiques	11
II.2.2.1. Diversité - Régularité	11
II.2.2.2. Diagrammes rang-fréquence	12

I - LES PRELEVEMENTS

I.1. Travail à la mer - benthos subtidal

I.1.1. Localisation des stations

Les stations étudiées sont au nombre de 4 (Fig. 1). Trois d'entre elles sont des stations typiques d'unités bionomiques locales.

La station A est située dans le peuplement de l'hétérogène envasé. Ce peuplement occupe les dépressions situées entre les bancs de sable.

La station B est caractéristique du peuplement des sables fins à moyens envasés à *Abra alba*. Ce peuplement est installé sur une bande côtière qui commence après le Cap Blanc Nez et se poursuit en Mer du Nord. Il constitue le prolongement en milieu profond des peuplements intertidaux de bas niveaux.

La station D est typique du peuplement des sables moyens à *Ophelia borealis* installé sur le complexe de bancs de sable que l'on rencontre au large du site.

La quatrième station (Station C) est située au droit du canal de rejet. Elle se trouve sous l'influence directe de la centrale. Elle appartient au peuplement à *Abra alba*.

Le repérage de ces stations est effectué au DECCA-NAVIGATOR, MARK 21, dont la précision dans la région est de l'ordre de 50 à 100 mètres.

I.1.2. Techniques de prélèvement

I.1.2.1. Prélèvements quantitatifs

Les prélèvements quantitatifs sont effectués à l'aide de la benne SMITH MAC INTYRE (Fig. 2).

Cet engin prélève sur une surface de $0,1 \text{ m}^2$ un volume de sédiment variant de 7 à 10 litres (donc sur 7 à 10 cm de profondeur) en fonction de la nature du sédiment. La profondeur à laquelle s'enfoncent les mâchoires de la benne dépend essentiellement de la consistance et de la texture du substrat, la benne est d'autant plus efficace que celui-ci est fin et homogène. Le nombre de prélèvements a été fixé à 10, bien que dans les peuplements locaux 5 prélèvements soient suffisants pour appréhender les caractéristiques quantitatives des différentes espèces (SOUPLET, 1978). La surface ainsi échantillonnée est de 1 m^2 .

Un onzième prélèvement est effectué aux fins d'analyses granulométriques. Les échantillons sont tamisés sur une série de deux tables de tri à vide

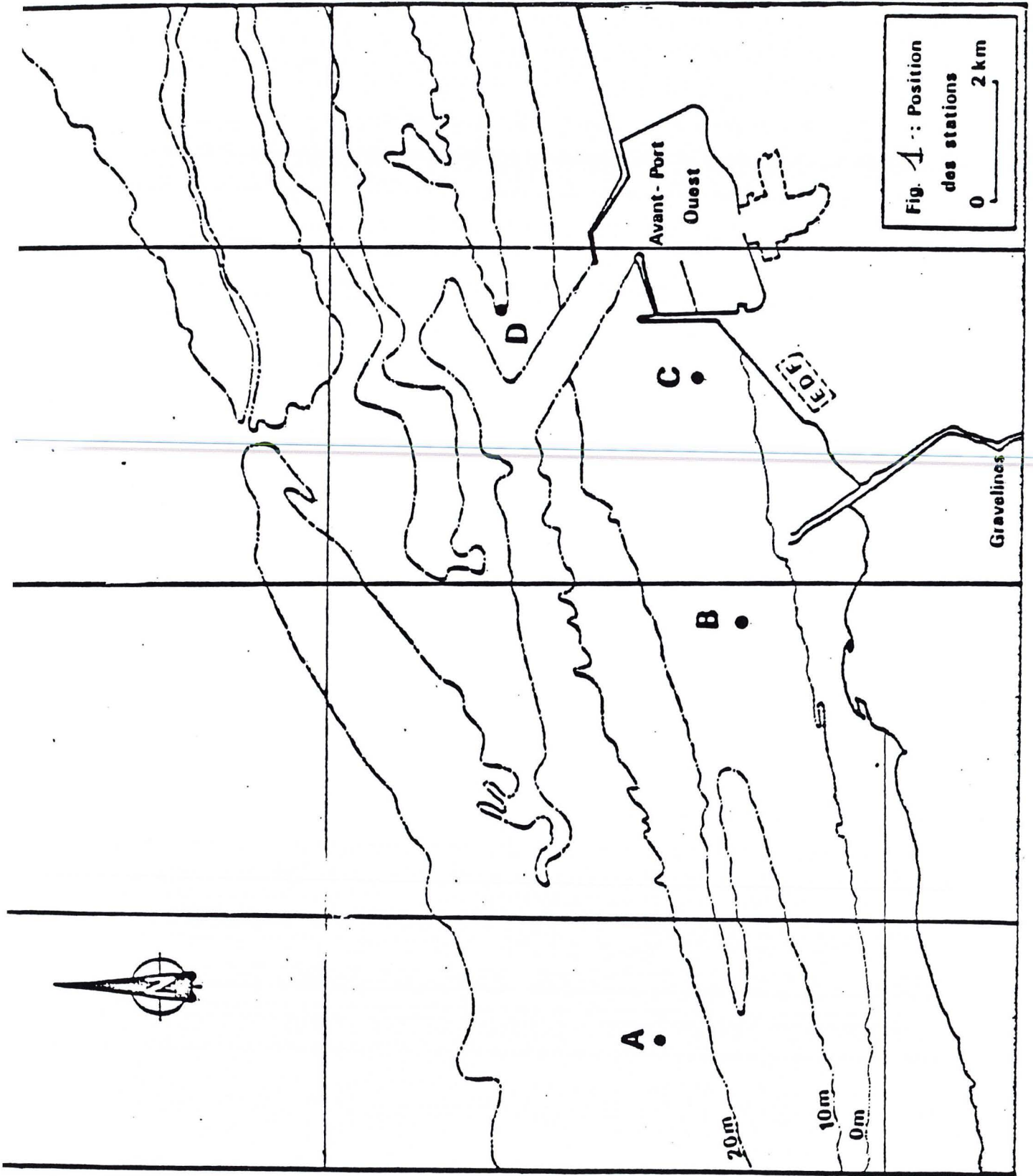


Fig. 1 : Position des stations

0 2 km

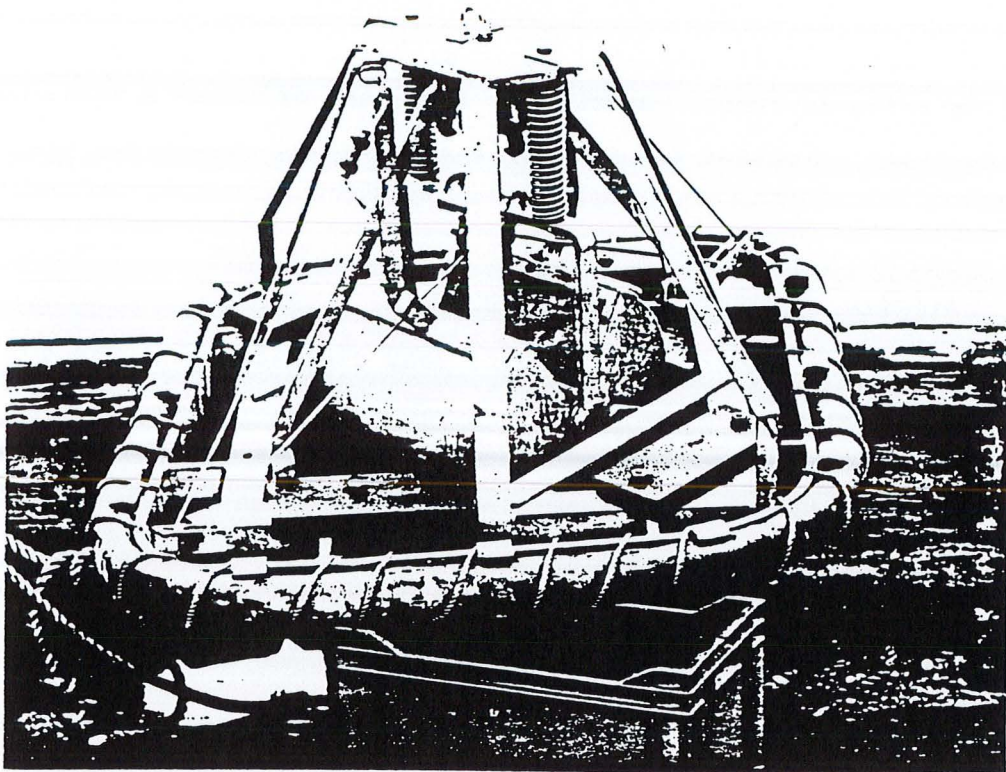


Fig. 2 : Benne Smith Mac Intyre

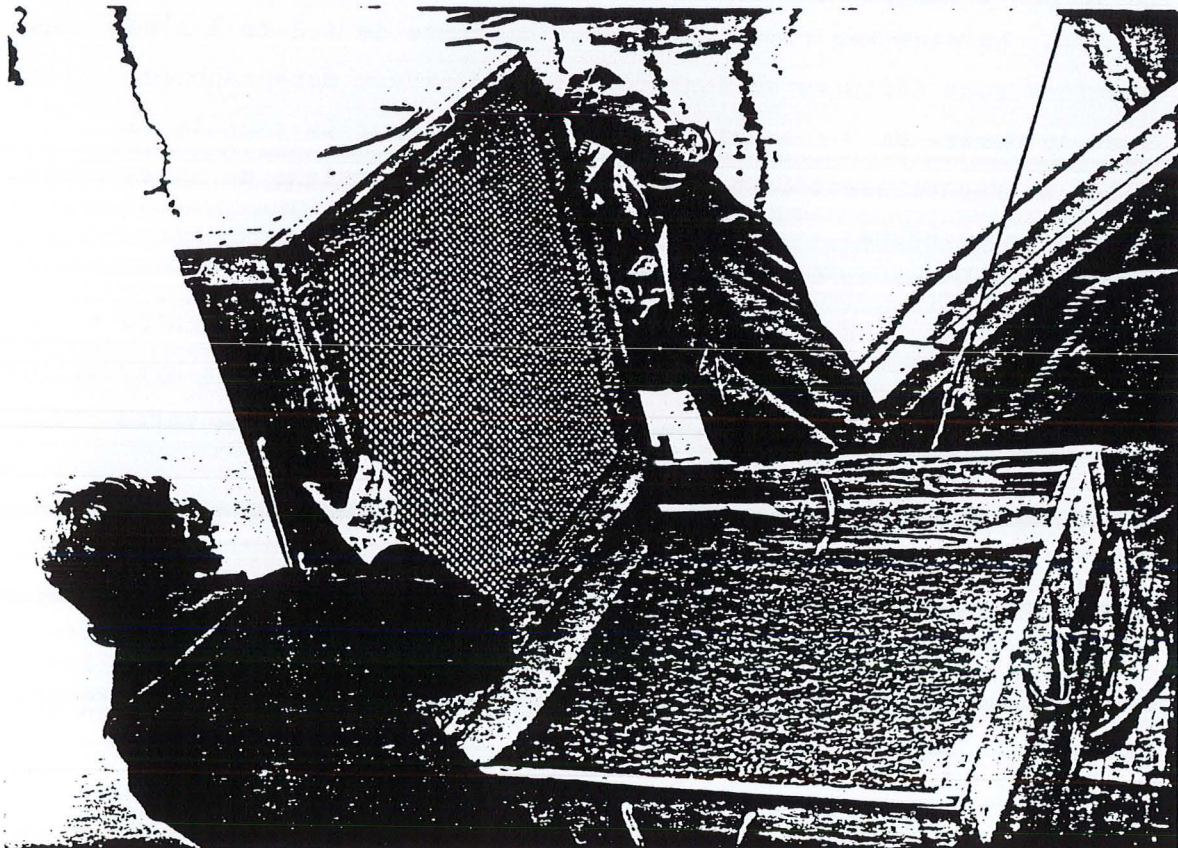


Fig. 3 : Table de tri

de maille successif de 1 cm et 1 mm (Fig. 3).

Le tri du refus de tamis, supérieur à 1 cm, est effectué à bord. Le refus de tamis inférieur à 1 cm est fixé au formol neutralisé salé à 10 %.

I.1.2.2. Prélèvements qualitatifs

Les prélèvements qualitatifs sont réalisés à la drague RALLIER DU BATY modifiée (Fig. 4).

La drague est traînée sur le fond pendant une durée variable (2 à 5 mm) selon la nature du fond. L'échantillon doit avoir un volume minimal de 30 litres. Si le volume est insuffisant, un nouveau prélèvement est réalisé pour compléter le premier. Un sous-échantillon est pris aux fins d'analyses granulométriques. Le prélèvement est tamisé de la même façon que les prélèvements quantitatifs.

I.2. Travail sur le terrain - Benthos intertidal

I.2.1. Localisation des radiales et des stations

Les deux radiales prospectées sont repérées grâce à des alignements. Elles sont orientées SE-NW.

La première radiale (Radiale I - Fig. 5) est située à 150 m du chenal de l'Aa. La deuxième radiale (II) est distante de 1,2 km à l'est. Les stations sont définies en fonction de leur niveau marégraphique. Elles sont au nombre de 9 : 5 sur la radiale I et 4 sur la radiale II.

Elles se répartissent de part et d'autre d'un complexe de dunes hydrauliques et de bâches :

- une station de bas niveau (côte maximale : + 1 m).
- une station de moyen niveau inférieur (côte comprise entre + 1 m et 2,5 m). Cette station est située en deçà des dunes hydrauliques.
- une station de moyen niveau supérieur (côte comprise entre + 2,5 m et + 4 m). Cette station est située au-delà des dunes hydrauliques.
- une station de haut niveau (côte approximative : + 5 m).
- une cinquième station est prospectée sur la radiale I. Elle est dite de "très haut niveau" : côte approximative + 5,5 m. Elle peut être scindée en deux sous-stations de manière à pouvoir échantillonner les différents aspects (envasés ou non) que la plage possède à cet endroit.

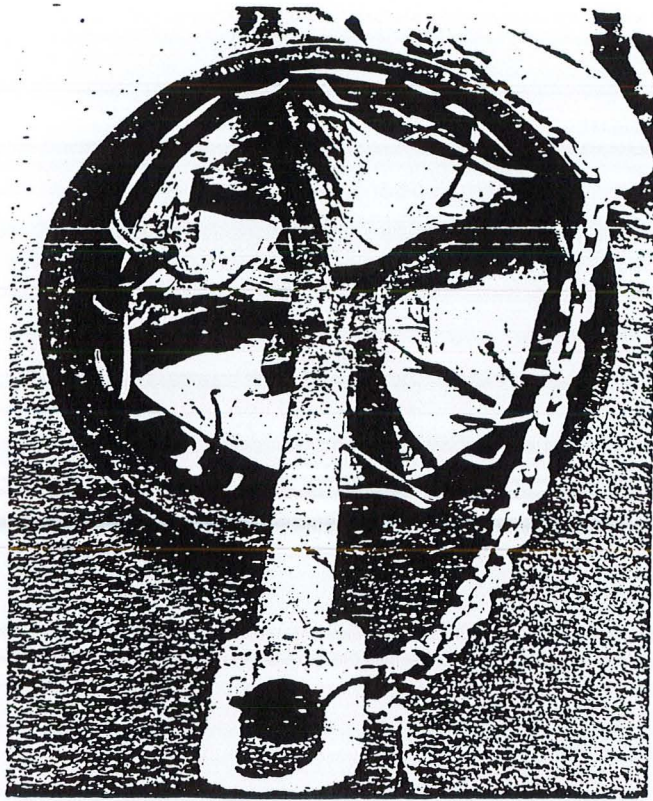


Fig. 4 : Drague Rallier Du Baty

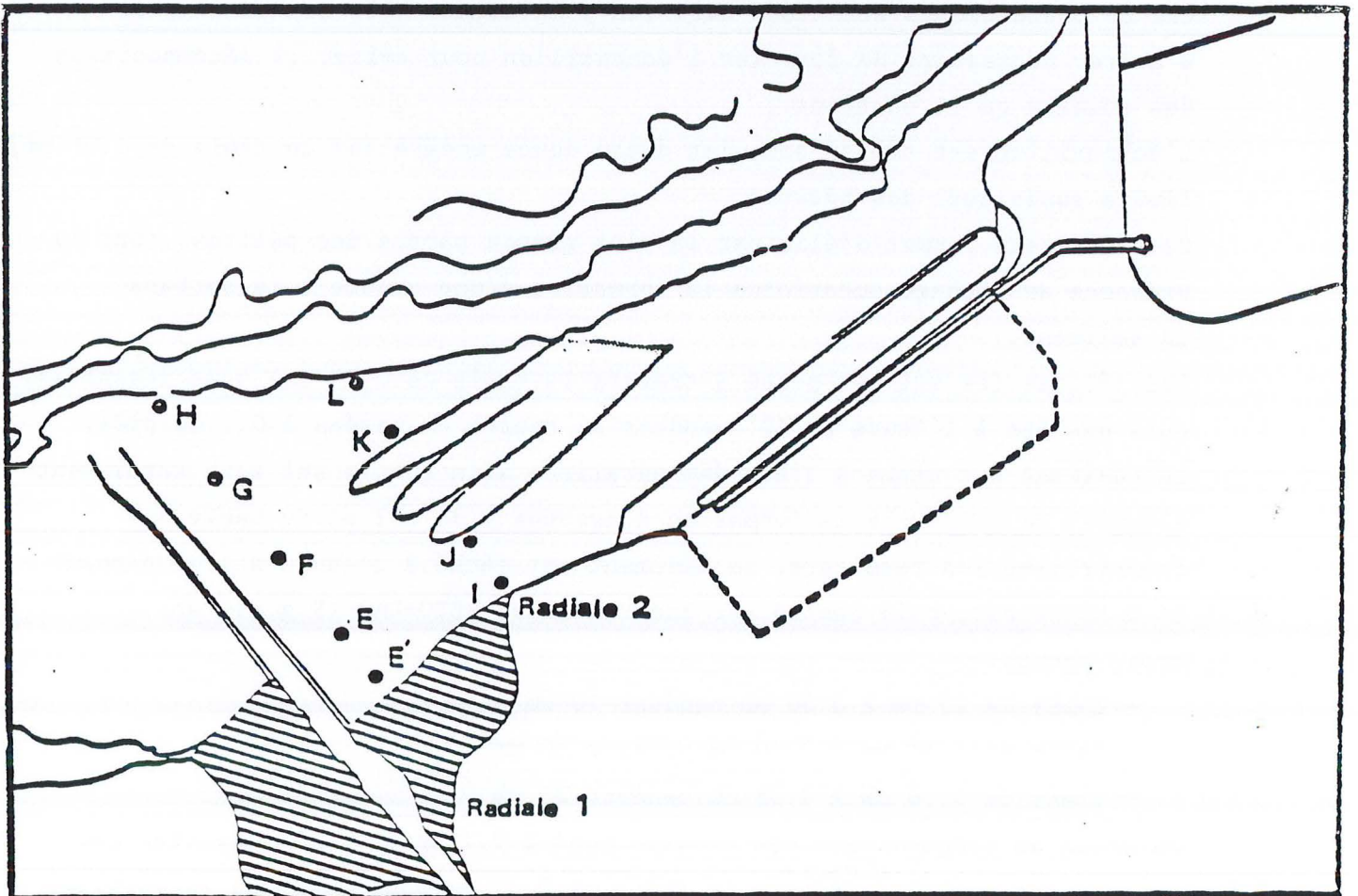


Fig. 5 : Position des stations

I.2.2. Prélèvement

Le prélèvement consiste en une prise de sédiment sur une hauteur de 15 cm et une surface de 1/4 de mètre carré. Dans ce but, 10 échantillons sont prélevés à l'aide d'un carottier en P.V.C. de 0,025 m² de section (Fig. 6).

Le tamisage du sédiment ainsi récolté est effectué dans des tamis du type DAVANT-SALVAT modifié GLAÇON (Fig. 7) dont le vide de maille est de 1 mm, limite inférieure couramment admise pour la macrofaune benthique. Le refus de tamis est intégralement fixé au formol neutralisé et salé à 10 %.

Un échantillon de sédiment est prélevé aux fins d'analyses granulométriques.

II - LE TRAVAIL AU LABORATOIRE

II.1 Analyse granulométrique

II.1.1. Traitement de l'échantillon

L'échantillon prélevé est conservé à la chambre froide. Dans le cas de prélèvements effectués dans des peuplements très riches il peut s'avérer nécessaire de formoler l'échantillon pour éviter la décomposition des animaux qu'il contient.

L'échantillon est tamisé sous jet d'eau douce modéré sur un tamis de 0,05 mm, limite supérieure des pélites.

Ce traitement permet d'éliminer la plus grande partie des pélites, dont la présence au séchage occasionne la formation d'une croûte à la surface du sédiment.

Les pélites (ce qui est passé à travers le tamis de 0,05 mm) sont décantées, puis séchées à l'étuve à 110° pendant 24 heures et pesées à 0,1 mg près.

Le sédiment est rincé à l'eau déminéralisée afin que le sel soit totalement éliminé, ce qui évite la formation d'aggrégats de sel et de sable qui fausseraient les résultats. Le sédiment est séché à l'étuve à 110° pendant 24 à 48 heures, puis tamisé sur une tamiseuse ROTO-LAB (Fig. 8) en trois séries.

- tamis de 20 mm à 0,80 mm pendant 10 mm
- tamis de 0,63 mm à 0,20 mm pendant 20 mm
- tamis de 0,16 mm à 0,05 mm pendant 20 mm

Le refus de chaque tamis est ensuite pesé à 0,1 mg près. Les pélites qui passeraient encore à travers le tamis de 0,05 mm sont ajoutées au résultat du tamisage sous eau.

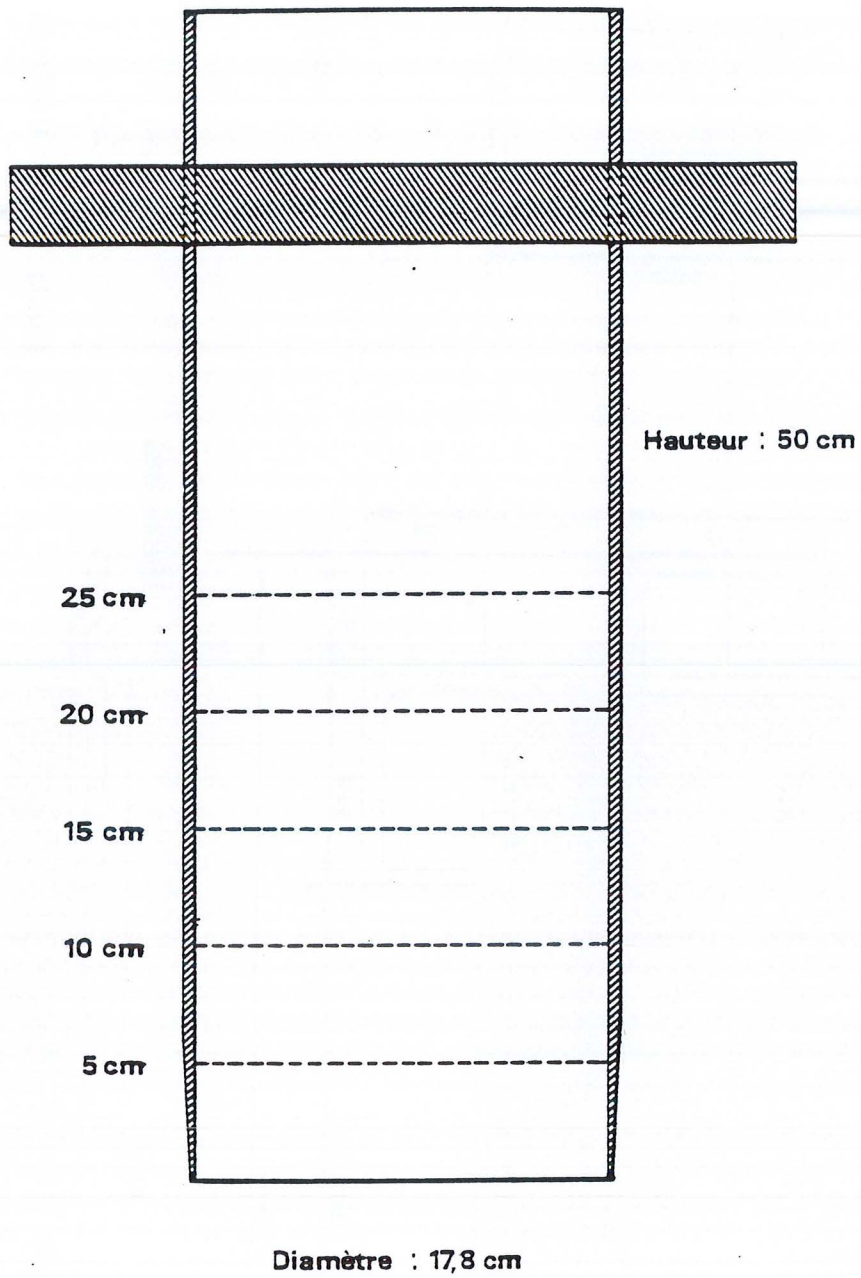


FIG. 6 : CAROTTIER PVC POUR PRELEVEMENTS INTERTIDAUX

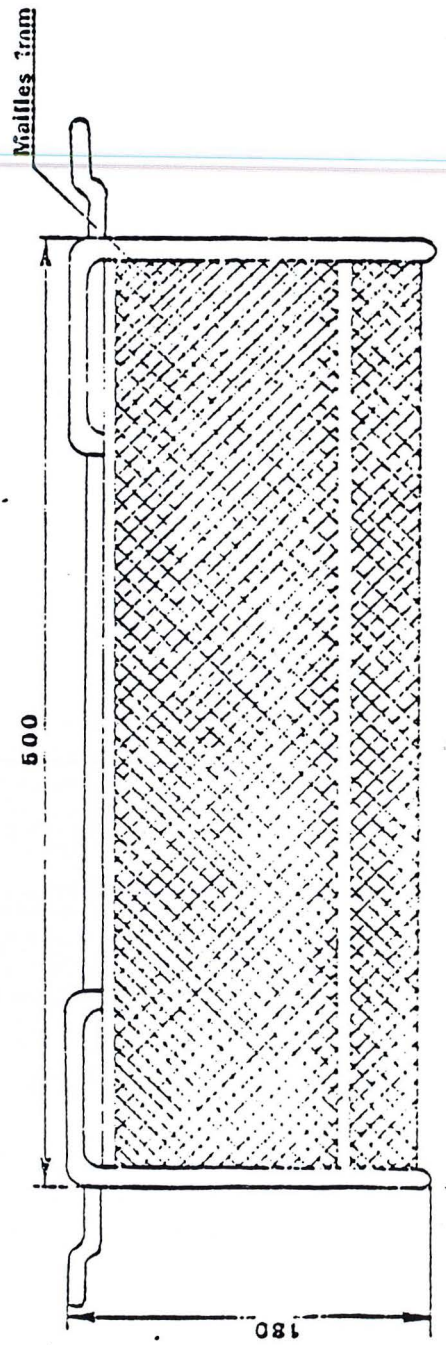
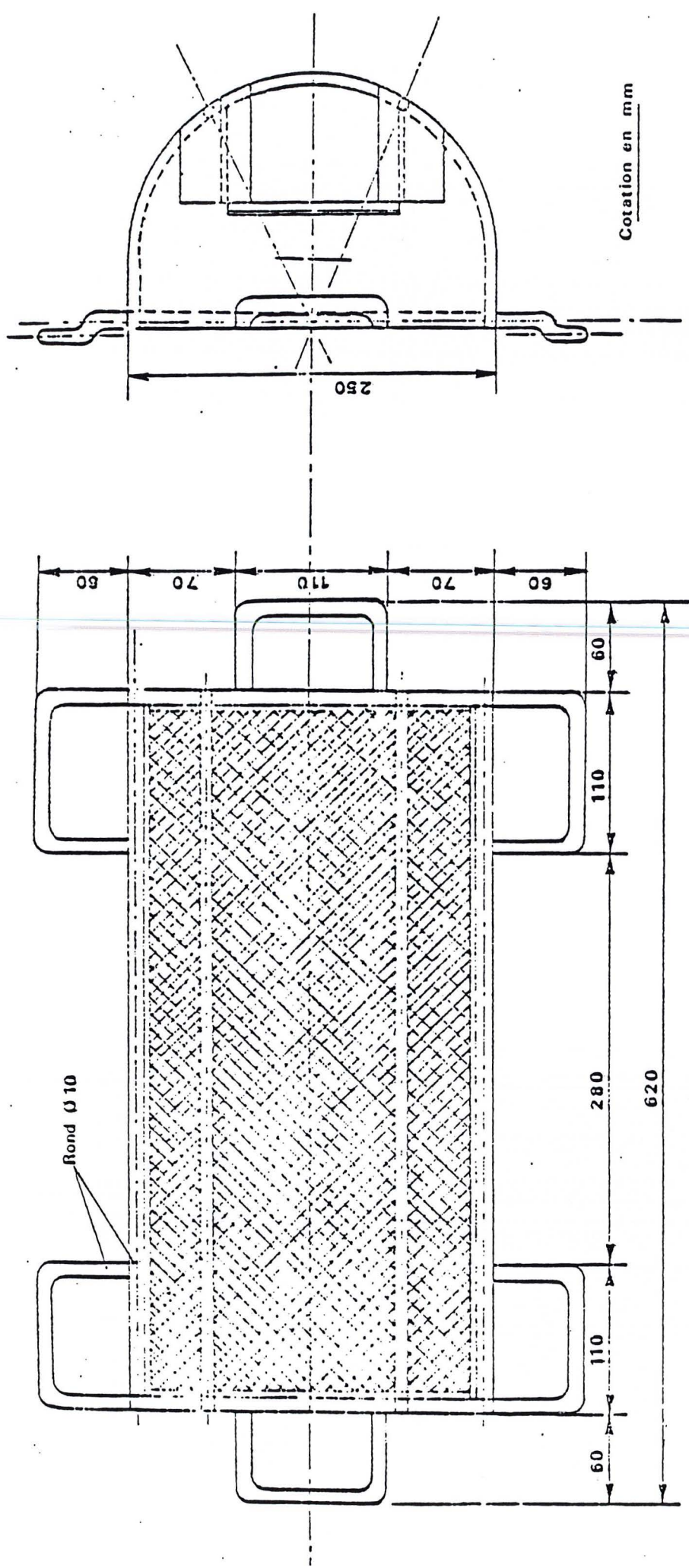


Fig. 7

Tamis Type DAVANT - SALVAT 1951
Modifié GLAÇON

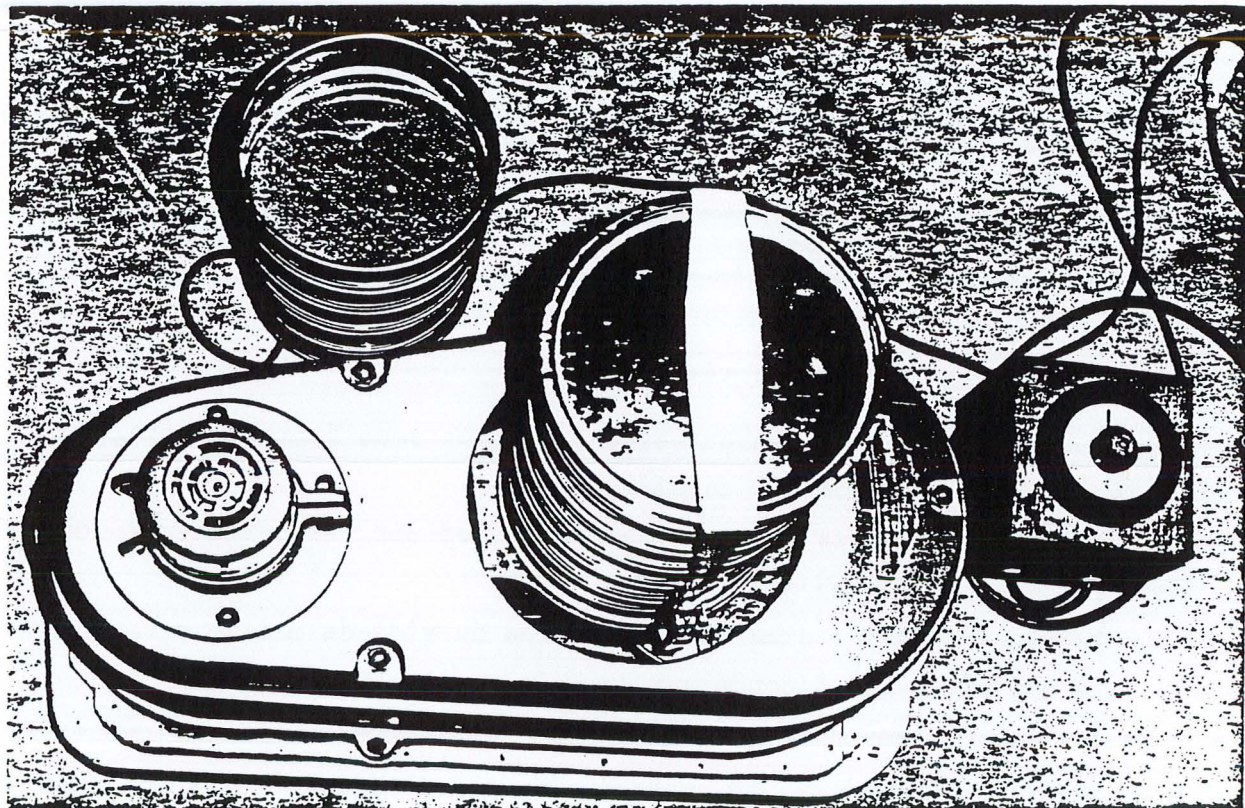


Fig. 8 : Tamiseuse Rotolab

Les résultats sont ramenés en pourcentage de l'échantillon total et rassemblés en catégories granulométriques selon la classification suivante.

Taille des particules	Catégories granulométriques
] 50 mm à 20 mm]	Cailloutis
] 20 mm à 5 mm]	Graviers grossiers
] 5 mm à 2 mm]	Graviers fins
] 2 mm à 0,5 mm]	Sable grossier
] 0,5 mm à 0,2 mm]	Sable moyen
] 0,2 mm à 0,05 mm]	Sable fin
inférieur à 0,05 mm	Pélites

II.1.2. Expression des résultats

Les résultats peuvent être présentés sous forme d'histogrammes ou de courbes de fréquences cumulées.

La courbe de fréquences cumulées permet de définir les paramètres utilisés pour la caractérisation du sédiment.

- la médiane (Md) : dimension théorique du vide de maille permettant le passage de 50 % pondéraux de l'échantillon.
- les 1er et 3ème quartiles Q1 et Q3 : dimensions théoriques du vide de maille permettant le passage de respectivement 25 et 75 % pondéraux du sédiment.
- l'indice de Trask permet de définir le classement d'un sédiment

$$So = \sqrt{\frac{Q3}{Q1}}$$

So croît avec le mauvais triage.

- les pentes des quartiles permettent d'évaluer la symétrie de la distribution des classes
 - . Pente arithmétique : $SKa = \frac{Q1 + Q3}{2} - Md$ (tend vers 0 quand la distribution se restreint).
 - . Pente géométrique : $SKg = \sqrt{\frac{Q1 \times Q3}{Md}}$ (tend vers 1 quand la distribution se restreint).

II.2 Etude faunistique

II.2.1. Etude systématique

La faune est séparée du sédiment par la méthode d'agitation - flottaison après coloration au rose bengale. Le refus de tamis est ensuite passé au tri direct, ce qui permet de récolter les animaux qui auraient échappé à la flottaison parce que trop denses.

Les individus sont déterminés jusqu'au niveau spécifique dans la mesure du possible. La nomenclature utilisée est celle du BNDO modifiée en fonction des parutions récentes d'ouvrages de systématique faisant autorité dans la communauté scientifique.

Après détermination et comptage, les animaux sont décalcifiés par un (ou plusieurs) passage (s) à l'acide chlorhydrique 1/10e, rincés à l'eau déminéralisée, séchés à l'étuve à 110° pendant un temps standard, variable selon les espèces. Les animaux, rassemblés par espèce, sont pesés au 1/10 mg.

II.2.2. Principe des analyses cénotiques

II.2.2.1. Diversité - Régularité

L'indice de diversité utilisé est celui de Shannon-Weaver (1948) de formule :

$$H = - \sum p_i \log_2 p_i$$

$$\text{avec } p_i = \frac{n_i}{N}$$

n_i = nombre d'individus de chaque espèce

N = nombre total d'individus

Si l'indice de diversité apporte une information importante au niveau d'un peuplement, il ne permet pas de comparer deux peuplements car il dépend des fréquences relatives des espèces et de leur nombre total qui peuvent être très différents d'un peuplement à l'autre. C'est pourquoi nous utilisons également la régularité :

$$E = \frac{H}{\log_2 Z}$$

(Z = richesse spécifique)

La régularité est le rapport de la diversité observée (H) à la diversité maximale théorique ($\log_2 Z$).

II.2.2.2. Diagrammes rang-fréquence

Ce diagramme obtenu en portant en abscisse les rangs des espèces classées par ordre d'abondance décroissante et en ordonnée les fréquences relatives ou absolues des espèces considérées. L'échelle peut être logarithmique ou semi-logarithmique.

Le diagramme rang-fréquence présente l'avantage de donner une représentation du peuplement plus synthétique que les indices de diversité. Il n'accorde pas une importance exagérée aux espèces rares. Il permet d'interpréter l'évolution écologique des peuplements.

CHAPITRE VI

PHYTOBENTHOS

Thomas BELSHER

IFREMER/Station Biologique/Roscoff
Département "Environnement Littoral"

S O M M A I R E

Méthodologie	1
- Esquisse de photo interprétation préparatoire	1
- Opérations de terrain	1
- Techniques d'échantillonnage	1
- Photo interprétation définitive	4
- Densitométrie optique	4
- Simulation SPOT et traitement d'images	4
- Aire minimale qualitative	5
- Aire minimale quantitative	5

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Disposition et surface des quadrats - Recombinaison des quadrats en surface croissante	6
Figure 2 - Courbe aire - espèces (points MOLINIER 20/1 et 20/2)	7
Figure 3 - a. Courbe aire - coefficient de SORENSEN	8
b. Courbe aire - coefficient de KULCZYNSKI	8

METHODOLOGIE.

Les végétaux chlorophylliens, et en particulier les algues pluricellulaires, si elles ne sont pas immergées, ou faiblement, signalent du fait d'une importante rediffusion dans le proche Infra-rouge, les émulsions sensibles à cette partie du spectre.

En fait, les signatures dans le proche Infra-rouge apparaissent fonction, non seulement de la vitalité et de la densité des peuplements visés, mais aussi, dans une certaine mesure, de leur composition spécifique.

A ce titre, la comparaison avec les résultats obtenus en utilisant une émulsion couleur est instructive et permet notamment de préciser les délimitations entre peuplements terrestres et marins.

Esquisse de photo interprétation préparatoire.

Sur photographie, sont sélectionnés les secteurs les plus représentatifs par la diversité de leur coloration.

Les zones d'égale apparence (zones isophènes) sont délimitées et reportées sur une carte IGN découvrant les secteurs concernés.

Opérations de terrain.

Un itinéraire est déterminé de façon à :

- vérifier la similitude des zones isophènes.
- identifier les différentes zones.
- prélever pour assurer l'identification et la quantification.

Techniques d'échantillonnage.

Deux techniques sont utilisées.

Prélèvements du peuplement.

Les relevés sont effectués par prélèvement du peuplement. Si la nature du terrain ne permet pas de prélever la couche superficielle du substrat, les espèces endolithes et la strate encroûtante ne sont pas prises en compte.

* Paramètres analytiques.

Nombre d'espèces.

Le nombre d'espèces dans un relevé est appelé T. La surface des relevés étant fixée, le nombre total d'espèces par relevé devient significatif par ses fluctuations, d'un relevé à l'autre.

Recouvrement.

Pour chaque espèce et dans chaque relevé, le recouvrement (R_i) est évalué. Il représente le pourcentage de la surface du relevé couverte en projection par l'espèce considérée. Ce pourcentage est compris

entre + (recouvrement négligeable chiffré, par convention, à 0.05 %) et 100 %. La végétation se disposant sur plusieurs strates, le recouvrement total d'un relevé ($R_t = \sum_1^n R_i$ n = nombre d'espèces du relevé) est généralement supérieur à 100 %. Le recouvrement est mesuré en laboratoire pour chaque espèce macroscopique. Pour une surface donnée de quadrat utilisé sur le terrain on trace une grille divisée en 100 unités.

Coefficient et densité de reproduction.

Dans chaque relevé, et pour chaque espèce, la présence (ou l'absence) d'organes reproducteurs, leur nature, ainsi qu'une appréciation de leur abondance ont été notées suivant l'échelle de reproductivité (G_i) :

- 0 : pas d'organes reproducteurs.
- 1 : organes reproducteurs très rares (RR).
- 3 : organes reproducteurs rares (R).
- 6 : organes reproducteurs communs (C).
- 10 : organes reproducteurs très communs (CC).

Le coefficient de reproduction cG d'un relevé sera :

- $cG = \sum^n R_i \cdot G_i$
- R_i = recouvrement de l'espèce i
- n = nombre d'espèces du relevé
- G_i = reproductivité de l'espèce i .

Ce coefficient permet de calculer la densité de reproduction

$$dG = \frac{\sum R_i \cdot G_i}{\sum R_i}$$

Indice de diversité.

Il traduit, dans un peuplement, la quantité totale d'informations résultant de la différenciation en espèces. Il a été calculé d'après la formule de SHANNON qui en fournit une bonne approximation.

$$IS \# \sum_1^n \frac{R_i}{R_t} \log_2 \frac{R_i}{R_t}$$

On considère généralement que l'indice de diversité traduit le degré d'évolution structural, la maturité, la stabilité d'un écosystème (ou de la taxocenose considérée). (BOUDOURESQUE et LUCK, 1972).

* Paramètres synthétiques.

Dominance qualitative.

Rapport exprimé en % de l'effectif d'un groupe d'espèces dans un relevé sur le nombre d'espèces du relevé.

$$DQ = \frac{Q}{T} \times 100$$

Dans un tableau, \overline{DQ} se calcule en faisant le rapport $\frac{\overline{Q}}{\overline{T}}$ et non pas la moyenne des DQ.

Dominance quantitative.

Rapport exprimé en % de la somme du recouvrement d'un groupe d'espèces d'un relevé ($\sum Ri$) sur le recouvrement total du relevé (Rt).

$$D Ri = \frac{\sum Ri}{Rt} \times 100$$

Dans un tableau, \overline{DR} se calcule en faisant le rapport $\frac{\sum \overline{Ri}}{Rt}$ et non pas la moyenne des $D Ri$.

Rapport R/P.

R/P : rapport dans un relevé du nombre de Rhodophycées au nombre de Phéophycées.

Tension.

La tension Ψ d'un ensemble d'espèces est le rapport de la dominance quantitative $D Ri$ et de la dominance qualitative DQ de cet ensemble d'espèces (BOUDOURESQUE, 1970, 1971).

D'après BOUDOURESQUE (1970) :

- un groupe en surtension ($\Psi > 1$) est certainement un groupe caractéristique du biotope.
- un groupe en sous-tension ($\Psi < 1$) est un groupe moins important pour le biotope : selon sa sous-tension, il est accessoirement ou fondamentalement inadapté au biotope.

Un groupe en surtension serait, en fait, le groupe le mieux adapté au biotope.

Biomasse.

Chaque individu prélevé est lavé à l'eau douce pour enlever les sels résiduels. Les épiphytes importants sont enlevés. La biomasse en poids sec est obtenue en pesant les individus d'un prélèvement après un passage de 24 heures dans une étuve réglée à 100°C.

Prélèvement de l'espèce dominante.

Seule l'espèce dominante du peuplement est prélevée sur des surfaces allant du 1/4 de m² au m².

Après un séchage sommaire, elle est ensachée et pesée sur place. L'objectif est bien sûr d'obtenir, le plus rapidement possible, un grand nombre de mesures. Au préalable, des courbes de corrélation "poids frais - poids sec" ont été établies à l'aide de relevés issus de la technique dite du "prélèvement intégral" effectués dans des peuplements similaires.

Les mesures poids frais obtenues sur place sont reportées sur cette courbe de corrélation qui permet d'obtenir leur équivalent en poids sec.

Photo interprétation définitive.

Des opérations de terrain complémentaires ont permis de "renseigner" les documents photographiques, les peuplements identifiés sont alors reportés sur les photomontages sommaires.

Densitométrie optique.

Le principe d'analyse repose sur un procédé de lecture par une caméra de télévision, élément par élément, de la mosaïque semi-contrôlée, éclairée par transparence ou réflexion. Le signal est transmis à la caméra et corrigé par un dispositif à mémoire qui élimine les hétérogénéités d'éclairage dues à la table lumineuse ou aux défauts du système optique. L'image est décomposée en dix classes de gris en progression linéaire ou logarithmique situées entre deux extrêmes sélectionnés par l'opérateur. A chaque gris est affectée une couleur et l'image ainsi transposée est restituée sur un écran cathodique.

Traiter un document par densitométrie optique revient donc à transformer la progression continue des densités exprimées par l'original photographique en progression discontinue de classes successives correspondant à autant d'équipages que le permet le dispositif technique.

Un programme rend ensuite possible, de façon automatique, le calcul des superficies correspondant à chaque équipage et, donc, à chaque peuplement considéré.

Simulation SPOT et traitement d'images.

Avec une résolution au sol de l'ordre de 20 m dans le mode "multibande" (couleur) (observation dans les trois bandes spectrales correspondant au vert-jaune, au rouge et à l'Infra-rouge) et de 10 m dans le mode "panchromatique" (noir et blanc) correspondant à l'observation dans une bande spectrale plus large (0.51 - 0.73 μm) ce satellite permettra, en particulier, la cartographie thématique dynamique à l'échelle du 1/50 000e des peuplements phytobenthiques d'une grande partie des zones intertidales. Ses possibilités s'étendent même, dans ce domaine, jusqu'aux peuplements végétaux de faible profondeur (- 5 à - 10 m).

Les images simulées utilisées pour l'instant proviennent de l'acquisition dans les canaux X.S.1., X.S.2., X.S.3.

Les données sont traitées au Centre IFREMER de Brest, sur le système COMTAL vision 1/20 grâce au logiciel GIPSY (G. BELBEOCH, DI/LTI) et à la méthodologie SOLE (L. LOUBERSAC, DERO/AT).

ETUDE D'AIRES MINIMALES.

Matériel et méthode.

La méthode d'échantillonnage employée pour l'étude de l'aire minimale consiste à prélever intégralement le peuplement à la surface de la roche. La surface de prélèvement est divisée en quadrats de taille croissante, disposés de façon contiguë mais non jointive (fig. 1). La taille des quadrats peut varier de 3 cm² à 50 cm².

Aire minimale qualitative.

L'aire minimale calculée par la méthode de la courbe aire-espèces est obtenue à l'aide des points Molinier 20/1 et 20/2. Le point Molinier 20/1 représente le point de la courbe tel que, si on augmente de 20 % la surface explorée, le nombre des espèces rencontrées augmente exactement de 1 %. La définition du point Molinier 20/2 est similaire et la projection du point sur l'ordonnée voit le nombre d'espèces augmenter de 2 % (BOUDOURESQUE et al., 1979, 1980). Les points sont déterminés graphiquement sur la courbe par approximations successives (fig. 2).

La méthode de la courbe aire-espèces communes utilise les mêmes points Molinier, mais la construction de la courbe ne tient pas compte des espèces présentant une fréquence inférieure à 10 %. Ces espèces exercent un effet sur la non-stabilisation de la courbe.

Aire minimale quantitative.

La courbe aire-coefficient de similitude de SORENSEN (1948) (fig. 3) et la courbe aire-coefficient de similitude de KULCZYNSKI (1928) sont obtenues en calculant ces indices sur des regroupements de quadrats contigus, de même taille et de surface croissante (fig. 4). La projection sur l'abscisse du point situé à la naissance de la stabilisation de la pente détermine l'aire minimale.

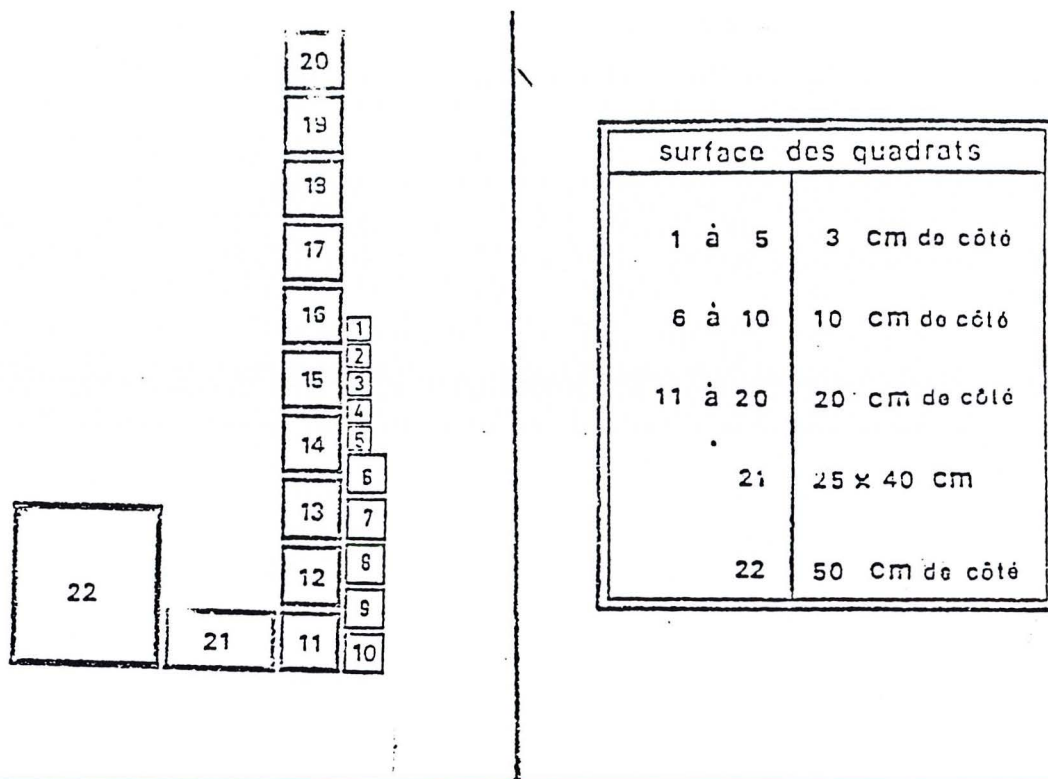
Les expressions mathématiques de ces coefficients sont les suivantes :

$$\text{SORENSEN } S_{pq}^s = \frac{2a}{T_p + T_q} \quad \text{variant de 0 à 1}$$

où a exprime la co-présence spécifique entre les deux quadrats p et q , T_p le nombre d'espèces du quadrat p , T_q le nombre d'espèces du quadrat q .

$$\text{KULCZYNSKI } S_{pq}^k = \frac{2 \sum_{i=1}^T \text{INF}(R_{ip}, R_{iq})}{R_{Tp} + R_{Tq}} \quad \text{variant de 0 à 1}$$

où R_{ip} exprime le recouvrement de l'espèce i dans le quadrat p ; R_{iq} , le recouvrement de l'espèce i dans le quadrat q . R_{Tp} exprime le recouvrement total de toutes les espèces du quadrat p , R_{Tq} celui du quadrat q .

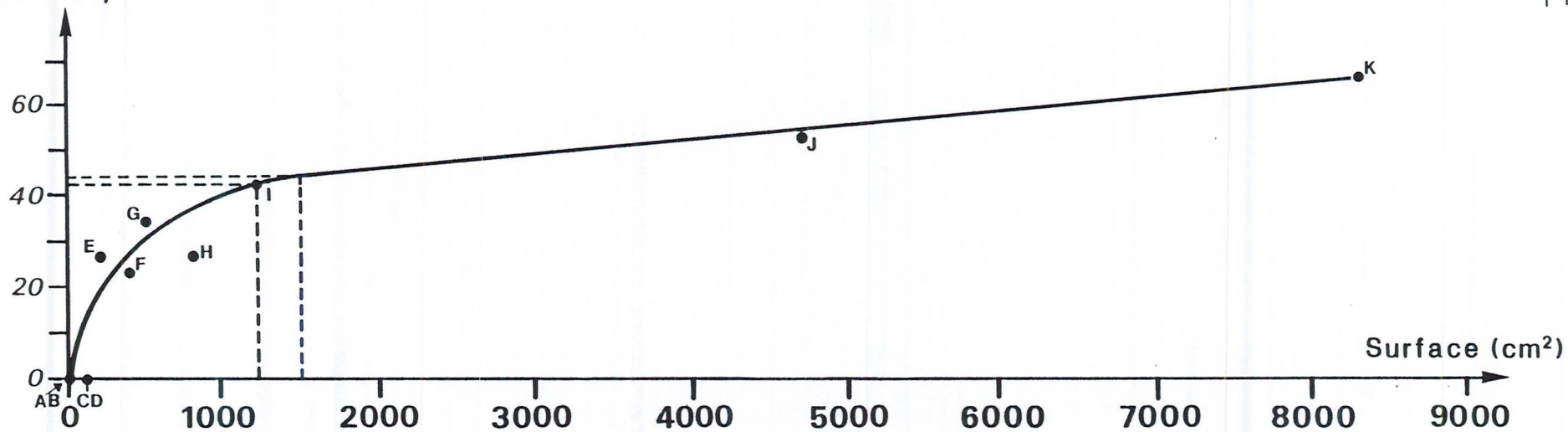


Quadrats	Surface (cm ²)	Nombre d'espèces
A	2	0
B	3 + 4	4
C	6	2
D	5 + 7	19
E	8 + 9	26
F	20	23
G	19 + 10	34
H	18 + 17	26
I	16 + 15 + 14	41
J	13 + 12 + 11 + 21 + 22	51
K	ENSEMBLE .	8036

FIGURE 1 : Disposition et surface des quadrats
Recombinaison des quadrats en surface croissante

- Courbe Aire-Espèces -

Nombre d'espèces



- Courbe Aire-Espèces communes -

Nombre d'espèces

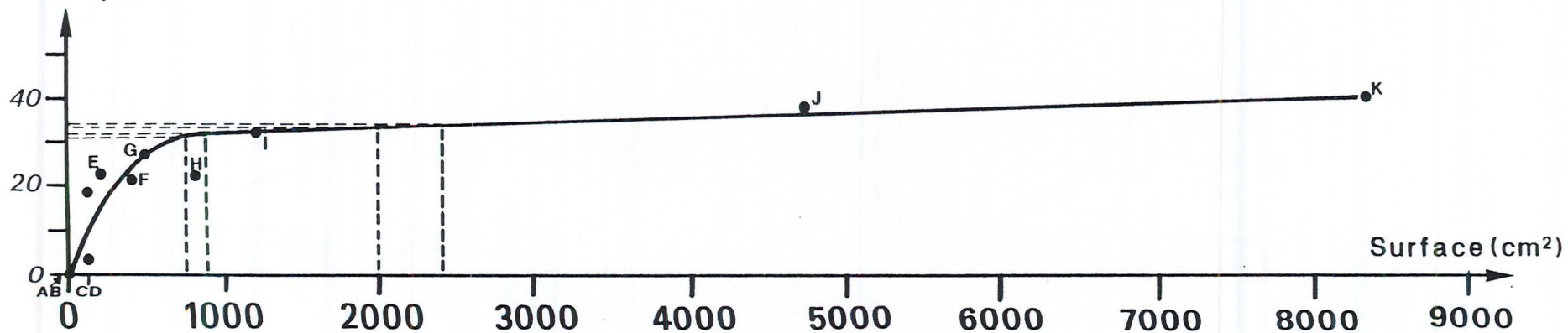


Figure 3.a : Courbe aire - coefficient de SORENSEN.

Coefficient
de SORENSEN

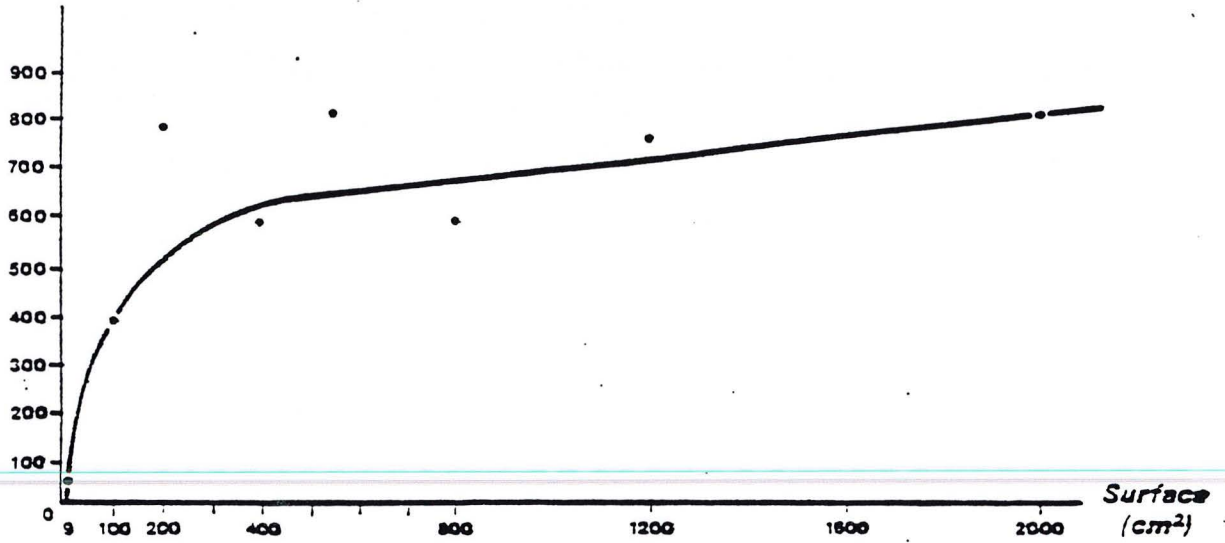


Figure 3.b : Courbe aire - coefficient de KULCZYNSKI.

Coefficient
de KULCZYNSKI

