Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 17 (1964)
Heft: 2

Artikel: Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique
Autor: Uehlinger, Verena
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739883

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 10.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

ÉTUDE STATISTIQUE DES MÉTHODES DE DÉNOMBREMENT PLANCTONIQUE

PAR

Verena UEHLINGER

TABLE DES MATIÈRES

		Pages
I	Introduction et problème	122
II	Appareillage et techniques	124
II. 1	Appareils utilisés	124
II. 2	Description des techniques	125
III	Analyse générale du dénombrement	129
III. 1	Analyse des étapes	129
III. 2	Précision désirable des méthodes	131
III. 3	Remarques sur le dénombrement des formes coloniales	133
IV	Prélèvement quantitatif et échantillonnage dans le prélèvement	138
IV. 1	Prélèvement quantitatif	138
IV. 2	Reproductibilité des prélèvements	139
IV. 2.1	Variance entre prélèvements pour une seule espèce	139
IV. 2.2	Variance entre prélèvements pour plusieurs espèces	142
V	Concentration et Chambres à dénombrer	146
V. 1	Méthodes de concentration indépendantes	146
V. 1.1	Filtration du mésoplancton	147
V. 1.2	Mésoplancton: variance de prélèvement et de préparation	149
V. 1.3	Ultrafiltration	151
V. 1.4	Centrifugation	155
V. 1.5	Décantation	156
V. 2	Chambres à dénombrer	157
V. 2.1	Chambre Sedgewick-Rafter	158
V. 2.2	Chambre combinée selon Utermoehl	159
V. 3.	Comparaison des chambres et des méthodes de concentration: méthodes combinées	160
VI	Dénombrement	167
VI. 1	Observation du sédiment	167
VI. 1.1	Carte du sédiment	167
VI. 1.2	Enregistrement mécanique	169
VI. 1.3	Transformation des résultats	170
VI. 2	Répartition des organismes dans la chambre à dénombrer	173
VI. 2.1	Tests de contrôle du sédiment	174
VI. 2.2	Remplissage des chambres rondes	177
VI. 2.3	Température de remplissage	178

Pages

VI. 2.4 Spécificité du sédiment 179
VI. 2.5 Sédiment dans chambre Sedgewick-Rafter 181
VI. 3 Dénombrement partiel 181
VI. 3.1 Comparaison de différents systèmes 185
VI. 3.2 Rapprochement du dénombrement partiel à la vraie valeur 191
VI. 3.3 Variance à l'intérieur des chambres 194
VII Méthodes optimales 195
VII. 1 Efficacité du dénombrement 195
VII. 1.1 Calcul de l'efficacité 195
VII. 1.2 Recherche de la précision optimale 198
VII. 1.3 Recherche de l'économie optimale 201
VII. 1.4 Application à différentes méthodes 203
VII. 2 Limitation du nombre d'organismes à dénombrer 205
VII. 2.1 Choix dans répartitions fortuites 205
VII. 2.2 Choix dans répartitions non-fortuites 207
VII. 2.3 Variabilité entre chambres avec plusieurs préparations 208
VIII. 1. Résumé 210
VIII. 1.1 Zusammenfassung 212
VIII. 1.2 Summary 215
VIII. 2 Remerciements 217
VIII. 3 Bibliographie 217
VIII. 4 Annexes:
I Glossaire statistique 219
II Systèmes de points répartis au hasard 221
III Planches 225

I. INTRODUCTION ET PROBLÈME

Parmi les nombreuses méthodes proposées pour l'évaluation quantitative du plancton, les méthodes de dénombrement prennent une place importante. La qualité et la quantité de travail qu'elles nécessitent sont souvent redoutées, mais la précision et la multiplicité des renseignements qu'elles peuvent fournir les rendent parfois indispensables.

Une fraction infime du volume planctonique total est observable. Le problème principal est donc un problème d'échantillonnage. Ce problème est particulièrement complexe par le fait que, à part les étapes où l'on peut intervenir mécaniquement pour obtenir une répartition au hasard, les échantillonnages sont effectués dans des ensembles ne présentant pas de répartition au hasard; ceci autant au niveau des prélèvements dans le lac, qu'au niveau de la chambre à dénombrer.

L'efficacité des méthodes utilisées est définie par la quantité d'informations fournies par rapport aux frais (durée du dénombrement, matériel nécessaire, connaissances spécialisées requises, etc.). La recherche de l'efficacité optimale, c'est-à-dire du maximum d'information, conduit à l'analyse des sources de variabilité et d'erreurs dans les différentes étapes de la préparation et l'exécution du dénombrement.

Les méthodes statistiques courantes, utiles pour une telle analyse, ont été énumérées en premier par RICKER (1937). Ensuite plusieurs auteurs ont proposé des méthodes adaptées à des cas particuliers. Un chapitre annexé à ce travail permettra, par la comparaison des différents procédés statistiques, une discussion au sujet des résultats des dénombrements présentés dans la littérature limnologique.

Les méthodes et appareillages pratiques proposés pour le dénombrement planctonique sont nombreux. Les valeurs fournies par chaque méthode ne sont pas toujours comparables. Même si le but de chaque méthode est de fournir des valeurs absolues, l'appréciation individuelle, la façon de poser le problème et les erreurs impliquées dans la méthode, aboutissent à des valeurs relatives, propres à chaque méthode.

Suivant les problèmes posés, les méthodes varient et même les questions pratiques en dépendent. Une seule étude ne peut être exhaustive et doit se limiter à un cadre restreint. Quelques questions ont été étudiées déjà:

GILBERT (1942) sur les colonies, et sur les sédiments dans la chambre Sedgewick-Rafter;

DIETERICH & STEINECKE (1955) et SCHMITZ (1953) sur la précision de l'ultrafiltration;

BALLANTINE (1953) sur la centrifugation, l'ultrafiltration et la culture, pour l'énumération du nannoplancton;

BARNES (1951) sur l'échantillonnage du plancton et l'application des distributions contagieuses;

MOORE (1952) sur la précision des dénombrements dans la chambre Sedgewick-Rafter;

LITTLEFORD, NEWCOMBE & SHEPHERD (1940) sur les dimensions des dénombrements dans la chambre Sedgewick-Rafter pour obtenir une précision désirée;

SERFLING (1949) sur la distribution du sédiment dans la chambre Sedgewick-Rafter et une discussion sur l'application des tests de « t » et de « u » dans l'appréciation des résultats;

LUND, KIPLING & LE CREN (1958) sur la méthode du microscope renversé, la qualité et les dimensions des dénombrements, et sur le problème des colonies;

JAVORNICKY (1958) sur la méthode d'Utermoehl (vitesse de sédimentation, dispersion du sédiment, etc.) et sur les méthodes de centrifugation et d'ultrafiltration dans des échantillons unispécifiques.

Le présent travail contribue à l'analyse des méthodes de dénombrement par l'étude systématique de trois d'entre elles: Utermoehl, Sedgewick-Rafter et ultrafiltration, et de toutes les étapes de la préparation du dénombrement. Par l'analyse des variances, l'importance des sources d'erreurs devient déterminable. Ensuite, par le calcul de l'efficacité du dénombrement, les conditions optimales de précision sont recherchées. En outre, ce travail contient une étude de l'échantillonnage dans un ensemble deuxdimensionnel à répartition non fortuite. La description détaillée des

techniques de prélèvement, conservation, concentration, dénombrement et d'enregistrement des résultats complète les rares indications publiées en langue française. Trois annexes se trouvent à la fin de l'étude:

1° Un glossaire des termes statistiques utilisés, avec quelques remarques concernant leur emploi;
2° Deux systèmes de points distribués au hasard sur une surface circulaire de 25 unités de diamètre;
3° Quatre nomogrammes pour la conversion des résultats de dénombrement.

Pour les études méthodologiques nous avons toujours travaillé avec des suspensions de plancton provenant de pêches effectuées dans le lac Léman. Les suspensions artificielles de cultures pures simplifient parfois le problème, mais ne présentent pas l'ensemble des difficultés que comprend le mélange naturel d'un grand nombre d'espèces différentes.

Si l'augmentation de la précision d'une méthode n'est pas toujours nécessaire, il est indiscutable qu'une diminution des frais de travail obtenue par une amélioration de la technique, tout en maintenant la précision au même degré, est d'un intérêt général.

II. APPAREILLAGE ET TECHNIQUES

II. 1. Appareillages utilisés

Prélèvements:

Bouteille Friedinger de 1 litre, suspendue à un câble qui est marqué à chaque mètre et qui est enroulé sur un treuil.

Transport et conservation:

Flacons cylindriques de 150 ml, avec couvercle en plastic;
Bouteilles de lait de 1 litre avec bouchon en caoutchouc.

Concentration:

a) Mésofiltration: erlenmeyer de 1 litre, sans fond, muni au goulot d'une petite pièce de soie à blûter; ouverture des mailles = 70 μ.
b) Filtration à membrane: appareil à filtrer en verre, selon Prof. Thiessen; membranes filtrantes « grob » n° 2, Ø 35 mm, Membranfiltergesellschaft Göttingen.
c) Centrifugation: tubes à centrifuger gradués de 15 ml: centrifugeuses Gerber de 4000 tours/minute.
d) Décantation: éprouvettes graduées de 20 ml, Ø 12,5 mm.

Chambres à dénombrer:

a) Selon Utermoehl: chambre tubulaire de 25 ml, chambre à plaques de 2,125 ml et chambre combinée de 50 ml, Zeiss, Oberkochen.
b) Chambre Kolkwitz de 1 ml.
c) Chambre Sedgewick-Rafter de 1 ml.

Microscopes:

Microscope renversé Zeiss, Oberkochen *.
Microscope normal Ortholux Leitz.

Compteur:

Compteur multiple à 12 places (3×4) Vary-Tally.

II. 2. Techniques

Les ouvrages décrivant les différentes techniques de préparation des échantillons et des chambres à dénombrer sont peu répandus. Il nous a paru utile de donner le détail des techniques utilisées afin que les critiques énoncées par la suite puissent être basées sur des données explicites et que l'intéressé puisse profiter de nos expériences pratiques.

1) Prélèvement d'un échantillon dans le lac:

fixer la bouteille ouverte au câble;
faire descendre la bouteille à la profondeur désirée et l'obturer par le messager;
remonter la bouteille fermée et remplir les flacons d'échantillon.

2) Répartition du prélèvement dans les flacons et fixation:

verser le contenu (ou une partie) de la pêche dans les flacons d'échantillon de 150 ml;
ajouter aussitôt 2 gouttes de Lugol pour la fixation et 2 gouttes de Lissin, mouillant qui facilite la pénétration du fixateur.

3) Transport et conservation:

transporter les flacons à l'abri de trop grandes chaleurs et de fortes secousses. En été, il est indiqué de préserver les échantillons du soleil;
conserver les échantillons en chambre froide (à 4° C), ce qui permet de les garder durant plusieurs mois; toutefois, il est nécessaire de rajouter tous les deux mois 2 gouttes de Lugol (le formol ramollit les organismes qui s'agglomèrent ensuite facilement).

---

* J'adresse mes remerciements à M. E. Novel, Dr ès sc., chef du Service d'hydrobiologie et de microbiologie des denrées alimentaires, qui a obligeamment mis à ma disposition un microscope renversé.

Concentration et préparation de la chambre:

4) Chambre tubulaire Utermoehl:

laisser l'échantillon atteindre la température ambiante;

remplir la chambre tubulaire en versant l'échantillon jusqu'à ce que l'eau déborde, puis couvrir rapidement avec la plaque de fermeture (utiliser si possible la « Füllkammer »);

poser la chambre sur une surface absolument horizontale, à l'abri du soleil, de la forte chaleur et de la poussière;

laisser sédimenter durant 18-24 heures (par exemple de 12 h jusqu'à 8 h du lendemain);

poser la chambre complète sur le microscope renversé en évitant les mouvements rapides et les rotations.

(L'évaporation qui se produit par capillarité entre le cylindre et le couvercle peut être évitée en plaçant la chambre sous une cloche, à côté d'un verre de pétri rempli d'eau.)

5) Chambre combinée Utermoehl:

laisser l'échantillon atteindre la température ambiante;

placer le cylindre sur la chambre à plaques, en appuyant pour empêcher l'eau de s'écouler;

remplir l'appareil avec l'échantillon fixé jusqu'à ce que l'eau déborde (éventuellement avec le cylindre à remplir « Füllkammer »), puis couvrir rapidement avec la plaque de fermeture;

il est nécessaire de poser le tout avec précaution sur un support bien horizontal, à l'abri du soleil, de la forte chaleur et de la poussière; éviter également une évaporation trop forte;

laisser sédimenter durant 18-24 heures;

faire glisser la partie supérieure de l'appareil sur la plaque de verre de mêmes dimensions que la chambre à plaques, en faisant suivre immédiatement la lamelle;

poser la chambre sur le microscope en évitant les mouvements rapides et surtout les rotations.

6) Concentration en éprouvette graduée:

remplir une éprouvette avec 20 ml de l'échantillon fixé et soigneusement brassé;

la poser bien verticalement sur une étagère à l'abri du soleil et de la forte chaleur;

laisser sédimenter durant 18-24 heures;

à l'aide de la trompe à vide, munie d'un siphon, enlever l'eau jusqu'au volume désiré et remettre soigneusement le sédiment en suspension (enlever un peu plus d'eau et compléter au volume désiré).

7) Concentration par centrifugation:

remplir deux tubes à centrifuger gradués de 15 ml d'échantillon fixé;

centrifuger pendant 10 minutes à 4000 tours/minute et laisser arrêter la centrifugeuse sans freiner;

laisser resédimenter un éventuel remous durant 30 minutes environ;

à l'aide de la trompe à vide munie d'un siphon, enlever l'eau jusqu'au volume désiré (en enlever un peu plus avec le siphon et compléter ensuite au volume exact: 0,8 ml pour la chambre Sedgewick-Rafter, ou 1,5 ml pour la chambre à plaque) et remettre le sédiment en suspension;

transvaser avec une pipette la suspension de l'un des tubes dans l'autre et mélanger.

8) Concentration par filtre à mésoplancton:

fixer une pièce de soie à blûter sous l'entonnoir;

filtrer 1 litre d'eau en tenant le goulot immergé dans un récipient contenant de l'eau filtrée jusqu'à 2 cm au-dessus du filtre (on évite ainsi l'écrasement des organismes contre le filtre);

laver le filtre avec le filtrat dans 100 ml d'eau filtrée (l'eau distillée provoque facilement des chocs hypotoniques et est à déconseiller pour les colonies délicates);

centrifuger 10 ml de cette suspension pendant 5 minutes à 2000 tours-minute;

décanter au siphon jusqu'à 1 ml dont on remplit la chambre Kolkwitz.

9) Préparation de la chambre Kolkwitz et de la chambre à plaques Utermoehl:

prélever de la suspension concentrée 1 ml, ou 2,125 ml respectivement, avec la pipette et remplir la chambre en évitant de créer un courant circulaire dans la chambre (cf. JAVORNICKY, 1958, sur remplissage par « trop-plein »);

couvrir aussitôt la chambre avec la lamelle sans laisser de bulles d'air;

placer la chambre sur le microscope en évitant les mouvements de rotation et laisser sédimenter pendant 15 minutes.

10) Préparation de la chambre Sedgewick-Rafter:

placer en diagonale la lamelle de fermeture sur la chambre;

prélever avec une pipette 1 ml de la suspension concentrée et soigneusement mélangée, et l'introduire par les deux ouvertures de la chambre (cf. STANDARD METHODS, 1955);

amener la lamelle pour fermer la chambre et laisser sédimenter pendant 8 à 10 minutes;

poser la chambre sur le microscope sans la bousculer.

11) Filtration par membrane filtrante (ultrafiltration):

préparer la membrane filtrante par une courte ébullition dans de l'eau distillée;

monter l'appareil en disposant sur le filtre en porcelaine un filtre de soie à blûter et par-dessus celui-ci la membrane encore humide;

connecter l'appareil avec la trompe à vide;
remplir le cylindre avec 10 ml d'échantillon fixé, à l'aide d'une pipette;
faire le vide jusqu'au moment précis de la disparition de l'eau;
rétablir la pression et éventuellement filtrer un deuxième volume de la même manière;
aspirer jusqu'à dessiccation complète;
sécher le filtre à l'étuve à 60° C durant 30 minutes (la membrane se rétrécit un peu);
supprimer les bords du filtre dépourvu de sédiment, dépassant la largeur d'une lame microscopique;
déposer une goutte d'alcool benzylique sur une lame et placer le filtre de façon à couvrir l'alcool benzylique;
déposer sur le filtre une petite goutte d'alcool benzylique;
ajouter en quantité suffisante le baume du Canada et couvrir d'une lamelle (32×24 mm);
laisser reposer la préparation pendant 24 heures au minimum (de très fines bulles d'air peuvent se former, mais se résorbent par la suite).

12) Observation au microscope normal:

L'objectif se trouve au-dessus de la chambre à dénombrer et l'observation du sédiment formé se fait à travers le couvre-objet et le liquide surnageant. Avec un bon microscope, l'observation d'organismes jusqu'à 20 μ minimum est possible (objectif 10× ou 24×, oculaire 6×, 8× ou 12×). La détermination exacte de certains organismes de cette grandeur est sujette à caution.

13) Observation au microscope renversé:

La position de l'objectif au-dessous de la préparation permet d'observer le sédiment avec de forts grossissements (jusqu'à l'immersion) dans les chambres à fond très mince (selon Utermoehl). Pour compter le nannoplancton, cette méthode est la meilleure.

14) Dénombrement dans la chambre entière:

a) une seule espèce: Pour dénombrer un organisme, le champ visuel parcourt systématiquement toute la surface de la chambre, soit horizontalement soit verticalement. UTERMOEHL (1927) propose, pour faciliter cette opération, un oculaire à réticule réglable dans lequel passent tous les organismes à dénombrer.

b) plusieurs espèces: On peut compter simultanément trois espèces au maximum. Le risque d'erreur augmente fortement avec le dénombrement simultané de plusieurs espèces; il est souvent préférable de compter chaque espèce l'une après l'autre. D'autre part, il n'est pas indiqué de compter les espèces fréquentes en même temps que les espèces rares.

15) Dénombrement dans une partie de la chambre:

Lorsque certains organismes sont trop nombreux dans le sédiment, le dénombrement de la chambre entière ne peut plus s'effectuer. Dans ces conditions, l'échantillonnage peut s'obtenir de deux façons:

a) systématiquement: en comptant les organismes qui se trouvent à l'intérieur d'une bande horizontale ou verticale, ou à l'intérieur de quatre bandes diagonales à travers le sédiment (UTERMOEHL, 1958);

b) au hasard: en comptant les organismes faisant partie d'un certain nombre d'aires réparties sur la surface entière de la chambre.

16) Enregistrement:

a) valeur totale: au cours du recensement, la présence de chaque individu contrôlé est marquée par une coche. Un compteur mécanique enregistre ces coches (une unité par individu) et en donne le total. Avec un compteur multiple, on peut enregistrer simultanément plusieurs espèces.

b) répartition des fréquences: elle s'obtient en sous-divisant la surface totale de la chambre en aires ou unités de surface; soit en champs visuels circulaires, soit en unités de surface carrées ou circulaires, obtenus par un réticule oculaire ou par un réticule placé sur la chambre. L'on peut ainsi noter la fréquence des organismes rencontrés dans chaque unité, ce qui permet un contrôle statistique de la dispersion du sédiment. L'utilisation d'un compteur multiple où chaque touche représente une fréquence, permet le dénombrement rapide d'une espèce.

c) carte de sédimentation: la surface entière est divisée en carrés (par exemple en millimètres carrés) par une fine plaque réticulée placée sous la chambre à dénombrer. Les fréquences observées dans chaque carré sont notées et reportées sur un plan complet de la préparation.

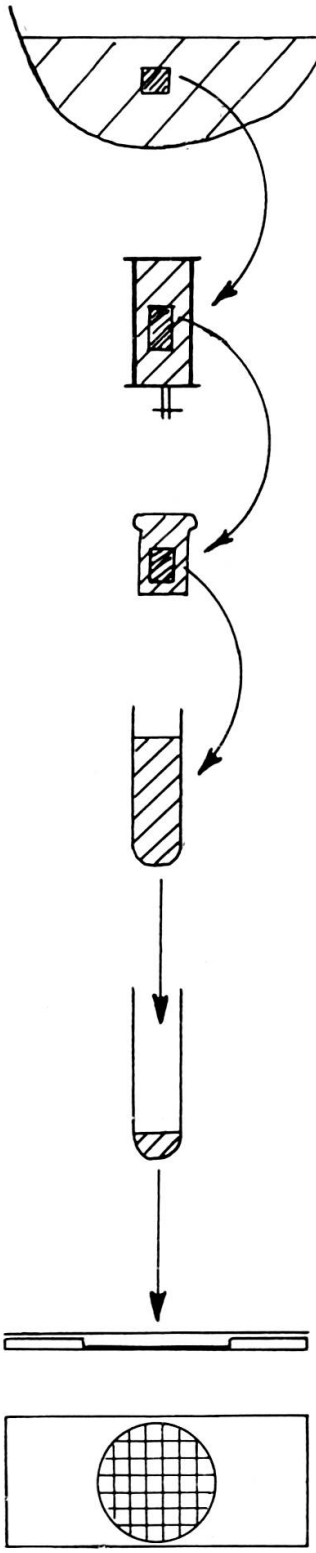
III. ANALYSE GÉNÉRALE DU DÉNOMBREMENT

III. 1. ANALYSE DES ÉTAPES

L'échantillon d'eau prélevé dans le lac subit plusieurs manipulations jusqu'au moment du comptage. Chacune de ces manipulations apporte une source de variabilité et, par défaut de méthodes parfaites, les erreurs systématiques ou non, de la manipulation même.

Toute la préparation se fait en six étapes différentes (fig. 1):

a) le prélèvement d'un échantillon dans le lac, à la bouteille,



a) Prélèvement d'un échantillon dans le lac.

b) Echantillonnage à l'intérieur du prélèvement (Flacons d'échantillons).

c) Fixation, transport, conservation. Eventuellement deuxième échantillonnage à l'intérieur des échantillons transportés.

d) Concentration.

e) Préparation de la chambre à dénombrer.

f) Comptage et transformation des valeurs relevées.

Fig. 1

Etapes de la préparation du dénombrement

b) l'échantillonnage à l'intérieur de ce prélèvement dont on remplit un ou deux flacons d'échantillon,

c) la fixation, le transport et la conservation de ces échantillons,

d) la concentration * de cet échantillon, soit en entier, soit en partie, par sédimentation, centrifugation ou filtration,

e) la préparation de la chambre à dénombrer,

f) le comptage d'un ou de plusieurs organismes dans cette chambre.

La méthode de la chambre tubulaire selon Utermoehl permet de ramener les étapes *d)* et *e)* en une seule opération. L'étape *d)* peut, suivant le degré trophique de l'eau, ne pas être nécessaire. Toutefois, pour le degré trophique du Léman par exemple, la concentration est très souvent indispensable, à l'exception de certaines fleurs d'eau. Dans le cas de la méthode de filtration par membrane, l'étape *d)* comprend la filtration même, l'étape *e)* la préparation du filtre pour le comptage. Les sources de variabilité et les erreurs introduites à chaque étape sont résumées dans le tableau 1. La distribution fortuite ou non fortuite des organismes dans le milieu où s'opère un échantillonnage impose une variabilité inévitable.

L'analyse de variance permet, d'une part, d'en déterminer l'importance et la nature (fortuite ou non) et, d'autre part, de déceler les erreurs systématiques inhérentes aux techniques. Les étapes qui peuvent introduire des erreurs importantes sont celles de la fixation, du transport et de la conservation, ainsi que celle de la préparation de la chambre à dénombrer.

III. 2. Précision désirable des méthodes

D'après Lund, Kipling & Le Cren (1958), « la plupart des observations expérimentales et écologiques concernent des successions de générations ou des changements de densité de l'ordre de 100 %. Dans de telles recherches une méthode qui peut évaluer les densités avec une précision de $\pm$ 50 % est adéquate, et tout temps utilisé pour augmenter cette précision est largement gaspillé ». Il est évident que le temps nécessaire pour augmenter la précision coûte cher, surtout puisque l'on sait que la précision n'augmente qu'avec la racine carrée du temps utilisé. Sans vouloir augmenter la précision de l'information, l'augmentation de précision des méthodes, par contre, permet un gain appréciable du temps consacré à l'opération.

Une autre remarque concerne les 50 à 100 % de précision utiles : l'étude d'un développement biologique implique presque toujours des progressions exponentielles; dans ce cas des estimations avec un coefficient de variation allant jusqu'à 100 %

* La « concentration » désigne dans tout le présent travail l'action de rendre la suspension plus concentrée. La « densité » désignera le nombre d'organismes par unité de volume.

TABLEAU 1

Sources de variabilité et d'erreurs dans les différentes étapes de la préparation et du dénombrement

Etape	Source de variabilité	Source d'erreurs
a) Prélèvement de l'échantillon	Distribution fortuite ou non-fortuite des organismes (stratifications et bancs)	techniques sélectives
b) Echantillonnage dans le prélèvement	Ensemble de base distribué au hasard	agglomérations
c) Fixation, transport, conservation		perte de volume mauvaise fixation destruction sélective par le transport ou la conservation brassage incomplet effritement des colonies erreurs de pipettage
d) Concentration de l'échantillon	Variabilité au hasard à l'intérieur des limites techniques	sédimentation incomplète imprécisions dans la réduction du volume
e) Remplissage de la chambre à dénombrer	Variabilité dans les limites techniques, au hasard	erreurs de pipettage technique déficiente du remplissage de la chambre (bulles d'air par exemple)
f) Comptage	Répartition selon Poisson	dispersion irrégulière du sédiment identification difficile des organismes sélection des champs de dénombrement facteurs de conversion

peuvent suffire. Par contre, il y a des cas où une plus grande précision est souhaitable; par exemple l'étude de migrations diurnes, saisonnières ou répondant aux variations climatiques, ainsi que la détermination stratigraphique, exigent des méthodes très précises.

III. 3. Remarques sur le dénombrement des formes coloniales

Gilbert (1942) constate dans le sédiment d'une chambre à dénombrer distribué au hasard, que les colonies (« occurences ») sont également distribuées selon les lois du hasard (loi de Poisson), mais que le nombre total d'individus ne suit aucune loi

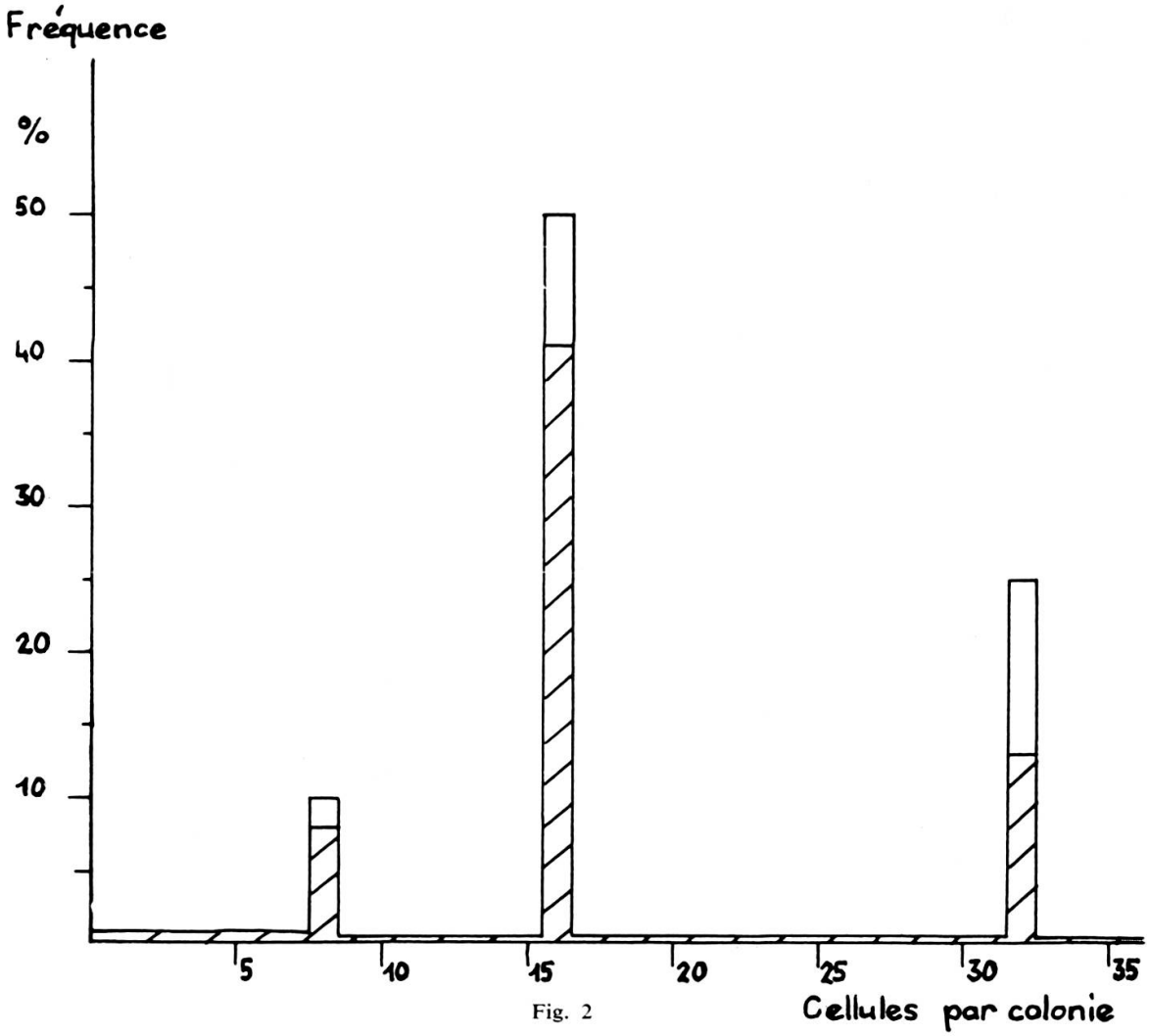


Fig. 2

Diagramme des fréquences.
Nombre de cellules par colonie de *Tabellaria fenestrata*, en période de forte croissance (dénombrement de 100 colonies)

Colonies en voie de division

Colonies à cellules semblables

prédictible. Le procédé le plus utilisé consiste en un dénombrement des colonies, et en une évaluation du nombre moyen d'individus par colonies. Toutefois, ce procédé doit être considéré avec prudence et n'est acceptable que dans certaines limites:

comme le montre le § VI. 2.4, le poids ou la forme de l'organisme influence sa distribution dans le sédiment. Il est ainsi possible que des colonies de dimensions très variables n'aboutissent que rarement à une distribution fortuite. D'autre part, la notion de « nombre moyen d'individus par colonie » est à traiter avec précaution: déjà LUND, KIPLING & LE CREN (1958) constatent pour les *Asterionella* que la courbe de fréquences du nombre d'individus par colonie est bimodale avec des sommets à 4 et à 8 cellules/colonie. Nos comptages des colonies de *Tabellaria* en période de forte croissance, indiquent une courbe de fréquence avec des sommets très élevés

TABLEAU 3

*Dénombrements répétés (A et B) des cénobes d'*Eudorina elegans *dans quatre séries de quatre échantillons différents (chambre combinée)*

Prélèvement	1		2		3		4	
Dénombrement	*A*	*B*	*A*	*B*	*A*	*B*	*A*	*B*
Série I	3	14	2	11	2	13	4	11
Série II	4	11	2	11	6	13	6	16
Série III	2	5	1	10	3	16	9	10
Série IV	2	20	7	10	1	19	4	10

à 8, 16, 32 et même 64 cellules/colonie. Les colonies avec des nombres intermédiaires possèdent des cellules de largeur distincte, en voie de division (fig. 2). Les divisions synchrones de toutes les cellules d'une chaîne aboutissent à une distribution dont la « moyenne » n'aurait que peu de sens. Ce n'est qu'au sommet du vieillissement de l'espèce qu'une désintégration des colonies provoque une répartition plus régulière des fréquences.

Par ailleurs, en dénombrant les individus par colonies, leurs dimensions sont négligées. Ce problème, qui est le même pour toutes les techniques de dénombrement des espèces à dimensions variables, a été résolu partiellement par la technique de mesure des aires de projection occupées par chaque individu (cf. STANDARD METHODS, 1955).

Une autre difficulté est celle des algues formant des cénobes. Pendant une période de croissance prolongée le cénobe augmente de volume et donne brusquement naissance à un grand nombre de jeunes cénobes. La technique de conservation des suspensions peut influencer la vitesse de dissociation des cénobes (par ramollissement de la gelée). Ce cas est mis en évidence dans l'expérience suivante: dans 16 échantillons contenant des cénobes *(Eudorina elegans)* au stade *palmella*, deux dénombrements successifs *A* et *B* sont effectués à deux mois d'intervalle. Le tableau 3 donne le nombre total de cénobes trouvés dans la chambre à dénombrer.

Le premier dénombrement *A* présente en moyenne 3,6 cénobes/chambre, le dénombrement *B* 12,5 cénobes/chambre. L'observation microscopique confirme une désintégration des colonies.

Les cellules de certaines colonies filamenteuses (Cyanophycées, Diatomées, etc.) sont difficiles à compter sans traitement préalable. Il est plus facile de mesurer ces filaments. Prenons le cas de *Melosira islandica*: les mesures faites dans quatre sédi-

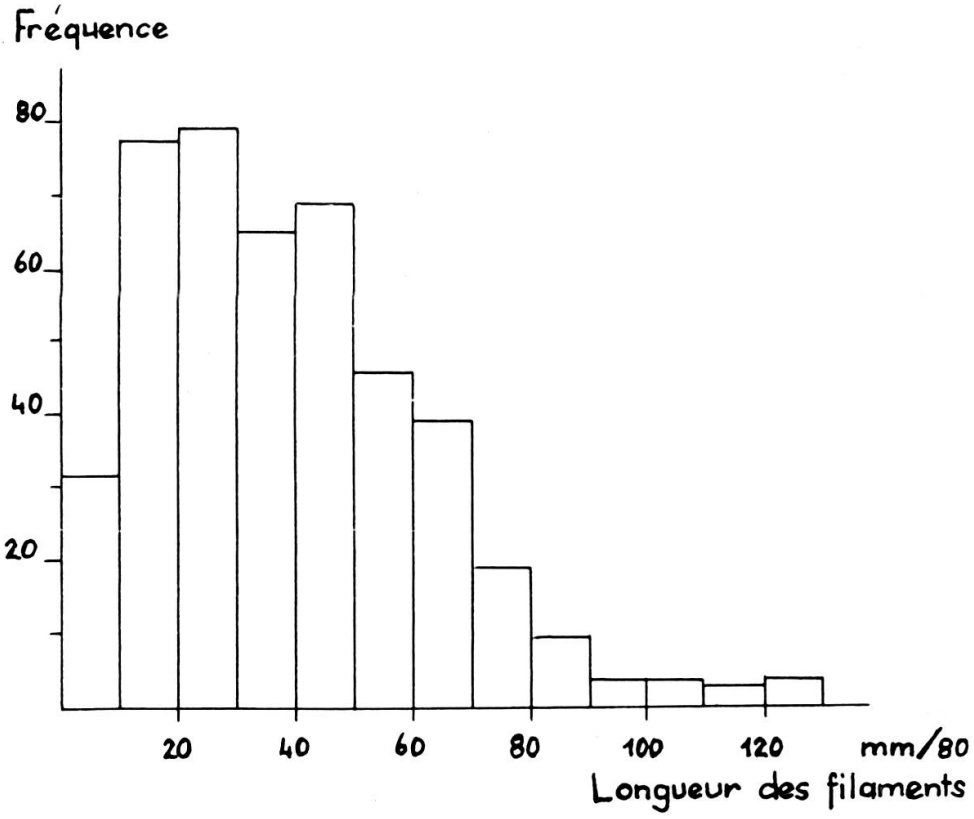


Fig. 3

Diagramme de fréquences des longueurs des filaments de *Melosira islandica*. Somme de quatre échantillons

ments de la même pêche (452 filaments) aboutissent à une répartition des fréquences plus ou moins continue (les longueurs des filaments sont exprimées en unités micrométriques représentant 1/80 de millimètre et sont groupés en classes de 10 unités). La longueur moyenne $\bar{x} = 39{,}34$ unités, c'est-à-dire 0,5 mm environ (fig. 3). Il est possible qu'en période de forte croissance, la courbe soit plus étalée, accusant éventuellement plusieurs sommets.

Ces différents points montrent que l'énumération des formes coloniales présente des problèmes spécifiques qui sont à traiter suivant le but recherché. Des évaluations de production exigent des méthodes volumétriques ou gravimétriques supplémentaires (éventuellement colorimétrie, quantité d'une substance spécifique, etc.). Une

étude comparative se contente des valeurs relatives données par le dénombrement soit des colonies, soit des individus.

Dans ces dernières études, il est cependant nécessaire de connaître la résistance des colonies à la dislocation imposée par la préparation du dénombrement.

Un exemple est donné par l'expérience suivante: dans quatre suspensions de 150 ml provenant de la même pêche, un échantillon de 20 ml est prélevé et examiné par la méthode de l'ultrafiltration. Cette opération est répétée quatre fois successivement dans chaque suspension. Les résultats des dénombrements, consignés dans le tableau 4.1, démontrent que par la répétition du brassage préalable à chaque prélèvement, le nombre de colonies par millilitre augmente (cf. analyse de variance 1°,

TABLEAU 4.1

Résistance des colonies de Fragilaria crotonensis *à l'ultrafiltration*
Quatre séries de quatre prélèvements après brassage

Dénombrement	Suspension	Nombre de brassages avant la filtration			
		1	2	3	4
1° Nombre de colonies par millilitre	I	22	14	14	21
	II	19	16	21	26
	III	15	15	22	21
	IV	15	16	18	19
2° Nombre de cellules dans dix colonies	I	179	154	130	162
	II	190	147	166	133
	III	180	144	142	140
	IV	192	166	152	157
3° Nombre de cellules par millilitre = 1° × 2°	I	394	216	182	340
	II	261	235	349	346
	III	275	223	316	298
	IV	278	270	272	306

tableau 4.2) tandis que le nombre de cellules par colonies diminue significativement (analyse de variance 2°, tableau 4.2). Si l'on multiplie les résultats des deux dénombrements, le nombre de cellules observées par millilitre est raisonnablement égal dans tous les échantillons. Cette expérience, prévue initialement pour tester la méthode de l'ultrafiltration, prouve la parfaite reproductibilité des résultats avec la méthode de l'ultrafiltration; par contre, le brassage de la suspension aboutit à un effritement partiel des colonies de *Fragilaria crotonensis*.

TABLEAU 4.2

Analyses de variance des valeurs du tableau 4.1
(la variance entre séries est partout insignifiante et n'est pas mentionnée)

Dénombrement	Source de variance	*DL*	Variance	$F_{\text{répétitions}}$
1° Nombre de colonies	Répétitions Reste	3 9	28,92 8,42	3,4 ($p = 0{,}07$)
2° Nombre de cellules dans dix colonies	Répétitions Reste	3 9	1306,4 133,1	9,8 ($p < 0{,}01$)
3° Nombre de cellules par millilitre	Répétitions Reste	3 9	5498 2780	1,98 ($p = 0{,}19$)

La résistance à l'effritement est spécifique et doit être déterminée à nouveau pour chaque espèce, ou même pour différents stades de la même espèce. Nous avons comparé la résistance de *Fragilaria crotonensis*, d'*Asterionella formosa* et de *Tabellaria fenestrata* dans une série de 16 prélèvements d'une même pêche. Chaque prélèvement est examiné deux fois: 6 à 8 semaines de conservation et un deuxième brassage distinguent le deuxième dénombrement du premier (cf. tableau 8.1, § IV. 2.2). Les différences entre les deux dénombrements sont examinées par le test de Student (tableau 5):

TABLEAU 5

Contrôle de la différence entre deux dénombrements successifs dans seize prélèvements

	Fragilaria	*Asterionella*	*Tabellaria*
$t = \frac{\bar{d}\sqrt{N}}{s}$	4,53	1,67	0,78
Degré de liberté	15	15	15
p	$< 0{,}001$	$> 0{,}05$	$> 0{,}05$

Fragilaria présente une différence significative, c'est-à-dire un nombre plus élevé de colonies dans le deuxième dénombrement: *Asterionella* et *Tabellaria*, par contre, ne présentent pas de différence significative. Les colonies de *Fragilaria*

semblent donc plus fragiles et plus sujettes à l'effritement par nos méthodes de conservation et de préparation du dénombrement. Au cours de nos études suivantes du dénombrement, il a été tenu compte des corrections nécessitées par le facteur de bris des formes coloniales. Il est évident que les exemples donnés ne sont valables que dans le cadre du problème abordé et que chaque nouvelle étude exige un effort semblable.

IV. PRÉLÈVEMENT QUANTITATIF ET ÉCHANTILLONNAGE DANS LE PRÉLÈVEMENT

IV. 1. Prélèvement quantitatif

De nombreux auteurs (Robert 1922, Dieterich & Steinecke 1955) ont constaté la grande incertitude que représente la collection quantitative du plancton par le moyen du filet. Pour un échantillonnage quantitatif l'utilisation d'un récipient de volume fixe, muni d'un mécanisme spécial d'ouverture et de fermeture, tel que la bouteille Friedinger, fournit des résultats plus valables. La bouteille Friedinger de un litre de volume s'est révélée utile dans l'étude présente.

Dans quelle mesure un litre, prélevé avec la bouteille, représente-t-il le milieu original ? Cette question pose un double problème:

1° le problème technique concernant la variabilité entre prélèvements effectués dans un milieu supposé fortuit quant à la répartition des organismes,

2° le problème de la dispersion fortuite ou non des organismes dans le lac ou, au moins, dans la partie choisie.

Au premier problème, on peut répondre par une analyse statistique de prélèvements répétés dans des conditions précises. Le second problème est plus délicat: le Léman, et le Petit-lac en particulier, n'est pas stagnant. Betant & Perrenoud (1932) ont établi des cartes détaillées des courants principaux moyens de la partie occidentale du lac de Genève. Dans les régions « pélagiques » (> 8 m de profondeur), Betant & Perrenoud (1932) indiquent des courants moyens de 3 cm/sec environ. Durant l'intervalle de 3 minutes (intervalle minimum entre deux prélèvements successifs avec une même bouteille), l'eau s'est déplacée. Même si les valeurs absolues fournies par Bétant et Perrenoud peuvent être sujettes à certaines réserves techniques, il en ressort clairement que deux prélèvements successifs au même endroit géographique ne se font pas dans le même volume hydrographique. Cependant, ces courants assurent dans le bassin du Petit-lac une répartition assez régulière des organismes suspendus passivement, dont l'équilibre est assuré par divers mécanismes biologiques

à l'exclusion d'une mobilité perceptible. Une stratification ne se présentera que pour des organismes dotés d'une mobilité active (cf. § IV. 2.2).

IV. 2. Reproductibilité des prélèvements

Les prélèvements répétés dans le lac, avec la bouteille Friedinger doivent fournir des échantillons de suspension qui représentent le milieu original selon une distribution fortuite. Toutefois, l'estimation de la récolte obtenue par chaque prélèvement ne peut s'effectuer sans dénombrement. C'est l'analyse de variance qui permet de séparer les erreurs introduites par le prélèvement de celles inhérentes au dénombrement.

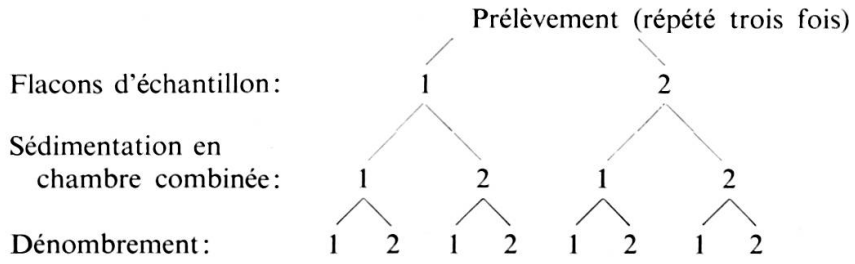
IV. 2.1. *Variance entre prélèvements et à l'intérieur des prélèvements, pour une seule espèce*

Une première expérience permet de déterminer la variance entre trois prélèvements répétés et la variance entre les flacons d'échantillons remplis avec le même prélèvement. Le facteur d'erreurs personnelles possibles, par exemple les erreurs de comptage, ou les fausses déterminations de l'espèce, est mesuré également.

Dans cette expérience, le dénombrement d'une seule espèce peut convenir.

Pour diminuer autant que possible les erreurs inhérentes au comptage, nous avons choisi un organisme lourd, sédimentant facilement et complètement, facile à identifier et se trouvant en densité favorable au dénombrement. Les filaments de *Melosira islandica* nous semblaient les plus indiqués (les filaments ne s'effritent pas au courant de la préparation).

Trois prélèvements de 1 litre chacun sont effectués à 3 mètres sous la surface (lac immobile, fonds à 6 m au large du Port-Noir) à intervalle de quatre minutes. Chaque prélèvement est sous-divisé comme suit:



Pour connaître l'importance de l'erreur personnelle, chaque chambre est comptée deux fois en entier, à une heure d'intervalle. Les résultats sont résumés dans les tableaux 6.1 et 6.2.

La moyenne générale est égale à $\bar{x} = 98{,}4$ filaments par chambre.

L'erreur personnelle (*CM* entre dénombrements) est petite; elle est insignifiante par rapport à la variance entre sédimentations:

$$F = \frac{79{,}46}{10{,}54} = 7{,}54 \quad p < 0{,}01.$$

TABLEAU 6.1

Dénombrements répétés de Melosira islandica *dans chambre combinée*

Flacon d'échantillon	Sédimentation en chambre combinée	Dénombrement	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
1	1.1	1.1.1	114	94	101
		1.1.2	103	91	94
	Total 1.1		217	185	195
	1.2	1.2.1	97	88	90
		1.2.2	102	92	90
	Total 1.2		199	180	180
Total 1			416	365	375
2	2.1	2.1.1	96	102	98
		2.1.2	93	99	100
	Total 2.1		189	201	198
	2.2	2.2.1	106	89	94
		2.2.2	107	86	95
	Total 2.2		213	175	189
Total 2			402	376	387
Total du prélèvement			818	741	762

Il en résulte néanmoins qu'un seul dénombrement est sujet à une erreur de $CV = 3{,}3\,\%$ dans notre cas.

$$(CV = \frac{\sqrt{10{,}54}}{98{,}4} \cdot 100\,\% = 3{,}3\,\%)\,.$$

La variabilité entre les différents sédiments, c'est-à-dire entre les préparations de la chambre à dénombrer est relativement importante. Elle est beaucoup plus

TABLEAU 6.2

Analyse de variance du dénombrement tableau 6.1

Source de variance	*DL*	*SC*	*CM* = variance
Prélèvements	2	369,09	198,05
Flacons d'échantillon	3	57,62	19,21
Sédiments	6	476,75	79,46
Dénombrements	12	126,50	10,54
Total	23	1056,96	

élevée que la variance entre flacons. Cette variance entre flacons est insignifiante par rapport à la variance entre prélèvements

$$F = \frac{198{,}05}{19{,}21} = 10{,}31 \qquad p > 0.05.$$

Il résulte de ce tableau que le premier échantillonnage à l'intérieur du prélèvement de 1 litre n'introduit pas de variance supplémentaire, et que le contenu des flacons d'échantillon représente fidèlement le volume entier du prélèvement. Le fait de remplir les flacons d'échantillon avant la fixation, avec un matériel vivant, en suspension naturelle, et le mélange qui s'opère pendant l'écoulement de cet échantillon dans le flacon, sont certainement un avantage qui évite une erreur de brassage, présente dans les étapes suivantes. Il n'est donc pas statistiquement nécessaire de prélever plusieurs flacons d'échantillon par bouteille de prélèvement.

La variance entre prélèvements semble relativement élevée. Une deuxième expérience avec un plus grand nombre de prélèvements répétés montrera l'importance de cette variance.

IV. 2.2. *Variance entre prélèvements : plusieurs espèces et plusieurs profondeurs, « pouvoir de résolution de la méthode »*

La variabilité entre prélèvements devrait s'exprimer de même manière pour toutes les espèces planctoniques. Utilisant le résultat du dénombrement d'un échantillon pour tester la méthode de prélèvement, il est nécessaire de vérifier ce point. Le fait que l'eau du lac s'écoule entre deux prélèvements introduit un autre facteur inconnu. L'expérience suivante est conçue de façon à tenir compte de plusieurs espèces différentes, de vitesses d'écoulement variables pour différentes profondeurs, et d'annuler entre deux prélèvements l'effet de cet écoulement.

L'organisation de la pêche doit donc écarter, dans la mesure du possible, des erreurs systématiques qui fausseraient les effets des conditions examinées; par exemple un effet du temps écoulé entre deux opérations pourrait soit diminuer, soit accentuer l'importance d'une stratification en profondeur. Notre plan de l'organisation d'une série de pêches répétées prévoit l'interversion intentionnelle de l'ordre des prélèvements. (Si un procédé systématique, introduisant en principe une erreur probable, ne fausse en réalité pas les valeurs cherchées, il peut sciemment être maintenu, et ensuite être mis en évidence ou en défaut par l'analyse statistique). Le plan des prélèvements se présente comme suit: au large du Port-Noir, la profondeur du lac atteint 8 m 50; quatre prélèvements en profondeur sont effectués tous les 2 mètres, à partir de 1 mètre sous la surface (*A*, *B*, *C* et *D*); une telle série est répétée quatre fois, dans l'ordre suivant (tableau 7):

TABLEAU 7

Ordre de prélèvement de seize pêches.
A, B, C, D = *premier, deuxième, troisième et quatrième prélèvement.*

Série de prélèvements		Première	Deuxième	Troisième	Quatrième
Profondeur sous la surface:	1 mètre	*B*	*D*	*A*	*C*
	3 mètres	*A*	*C*	*D*	*B*
	5 »	*D*	*B*	*C*	*A*
	7 »	*C*	*A*	*B*	*D*

Avec cette disposition, la séquence des prélèvements ne devrait pas avoir d'influence systématique à l'intérieur d'une série. Si le temps exerce un effet sur la stratification, cela se manifesterait entre les séries successives. Les seize prélèvements ont été effectués en trois quarts d'heure à partir de 16 heures, par temps ensoleillé. De chaque prélèvement, un seul flacon d'échantillon est conservé; de chaque échantillon, deux dénombrements sont faits en chambre combinée de 50 ml.

Le pouvoir de résolution d'une méthode se montre surtout dans les faibles fréquences qui présentent, selon la loi de Poisson, des variances élevées par rapport à la moyenne. C'est pourquoi, à côté des organismes fréquents tels que *Asterionella* et *Fragilaria*, nous avons dénombré quelques espèces rares.

Organismes dénombrés:

Unicellulaires :	passif:	*Ceratium hirundinella*	(Péridinien)
	nageur:	*Codonella lacustris*	(Rotateur).
Colonies :	nombreuses:	*Asterionella formosa*	(Diatomée)
	fréquentes:	*Fragilaria crotonensis*	»
	»	*Melosira islandica*	»
	rares:	*Tabellaria fenestrata*	»
		Gemellicystis lundi	(Chlorophycée)
		Eudorina elegans	»
Crustacé :	nageur:	*Daphnia hyalina*	(Crustacé).

Le dénombrement entier de la chambre évite les variabilités considérables dues à la méthode de la chambre combinée (cf. § VI. 3). Les résultats des dénombrements sont résumés dans le tableau 8.1 et présentent le nombre d'individus, de colonies ou de filaments trouvés dans un volume de 50 ml d'eau du lac.

TABLEAU 8.1

Dénombrement, dans quatre prélèvements, à quatre profondeurs différentes, de neuf espèces planctoniques
Nombre d'individus ou de colonies par 50 ml d'eau

Organisme	Profondeur	Séries de prélèvements							
		Première		Deuxième		Troisième		Quatrième	
		Dénombrement		Dénombrement		Dénombrement		Dénombrement	
		1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Ceratium (individus)	1 m	4	7	11	2	9	4	4	8
	3 m	4	4	9	9	1	10	6	5
	5 m	7	8	8	9	6	11	4	13
	7 m	8	7	5	7	9	7	11	9
Codonella (individus)	1 m	29	46	30	32	26	33	27	44
	3 m	40	53	63	47	42	41	44	60
	5 m	37	55	36	40	47	37	39	47
	7 m	60	93	47	64	62	57	63	52

Organisme	Profondeur	Série de prélèvements							
		Première		Deuxième		Troisième		Quatrième	
		Dénombrement		Dénombrement		Dénombrement		Dénombrement	
		1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Asterionella (colonies)	1 m	76	108	58	79	68	87	82	102
	3 m	80	72	96	88	80	79	74	83
	5 m	67	79	83	76	104	88	84	80
	7 m	72	102	94	92	75	102	119	104
Fragillaria (colonies)	1 m	33	41	28	35	27	40	20	27
	3 m	38	34	25	31	14	24	29	39
	5 m	12	28	29	26	30	32	27	32
	7 m	22	36	24	41	35	36	28	31
Melosira (filaments)	1 m	17	13	13	9	11	14	14	12
	3 m	27	14	17	10	11	19	24	18
	5 m	21	11	14	11	15	18	12	10
	7 m	20	18	40	12	23	26	16	18
Tabellaria (colonies)	1 m	4	1	0	2	2	1	0	1
	3 m	3	1	0	0	0	3	2	2
	5 m	0	0	3	4	1	1	2	0
	7 m	2	0	2	2	1	1	3	1
Gemellicystis (cénobes)	1 m	3	9	6	6	6	6	5	5
	3 m	2	4	7	4	8	6	2	5
	5 m	7	10	5	4	3	9	6	13
	7 m	3	9	10	2	5	9	3	7
Eudorina (cénobes)	1 m	3	14	2	11	2	13	4	11
	3 m	4	11	2	11	6	13	6	16
	5 m	2	5	1	10	3	16	9	10
	7 m	2	20	7	10	1	19	4	10
Daphnia (individus)	1 m	0	0	0	0	0	0	1	1
	3 m	1	1	4	1	3	0	1	3
	5 m	7	13	9	9	6	5	6	13
	7 m	2	0	0	0	1	4	1	1

Le tableau 8.1 des dénombrements montre en premier lieu les fréquences très variables entre espèces mais relativement stables entre les dénombrements répétés, à part les *Eudorina* dont les cénobes se dissocient déjà pendant une courte période de conservation.

Les analyses de variance, résumées dans le tableau 8.2 indiquent une variance considérable entre dénombrements, par rapport aux autres sources de variance, et ceci chez toutes les espèces.

L'interaction est nulle partout (tableau 8.2). Nous pouvons donc comparer les variances entre séries et les variances entre profondeurs avec la variance entre dénombrements. Pour toutes les espèces, la variance entre séries n'est pas significative ($F > F_{0,05}$), c'est-à-dire la répétition des séries n'introduit pas une variabilité (erreur) qui dépasse celle du comptage. Ceci indique également qu'à l'intérieur des trois quarts d'heure de pêche, la dispersion des organismes ne s'est pas modifiée.

TABLEAU 8.2

Analyses de variance des résultats du tableau 8.1

	Variance (carré moyen) entre			Interaction
	Profondeurs	Séries	Dénombrements	
Degré de liberté	3	3	16	9
Ceratium	10,87	3,37	4,01	10,44
Codonella	1182,24	107,87	65,93	96,91
Asterionella	329,3	126,8	228,7	148,7
Fragilaria	37,23	2,57	81,72	42,88
Melosira	124,42	8,58	25,78	40,19
Tabellaria	0,062	0,229	2,715	1,281
Gemellicystis	7,62	1,45	5,89	9,03
Daphnia	114,25	1,37	3,48	3,78

TABLEAU 8.3

Moyenne totale $\bar{x}$ d'organismes/50 ml
Coefficient de variation CV *et présence de différences entre séries répétées et entre profondeurs*

	$\bar{x}$	$CV\ (= s_{\bar{x}}\ \%)$	Existence de différences entre	
			Séries	Profondeurs
Ceratium	7,06	40 %	—	—
Codonella *	(46,7)	indéterminé	—	significative
Asterionella	85,4	10 %	—	—
Fragilaria	29,8	15 %	—	—
Melosira	16,5	15 %	—	—
Tabellaria	1,41	50 %	—	—
Gemellicystis	5,91	35 %	—	—
Daphnia *	(2,91)	indéterminé	—	significative

* Espèces stratifiées.

Entre les différentes profondeurs nous ne constatons aucune inégalité significative dans les espèces *Ceratium*, *Asterionella*, *Fragilaria*, *Melosira*, *Tabellaria* et *Gemellicystis*, c'est-à-dire parmi les organismes flottant passivement. Les organismes nageurs, par contre, *Codonella* et *Daphnia*, présentent des densités significativement différentes entre profondeurs. Ces organismes sont donc stratifiés en couches horizontales. Puisque le phénomène se maintient durant les quatre répétitions, pendant que le volume d'eau s'est déplacé de plusieurs mètres, ces stratifications affectent des étendues importantes. En conclusion écologique, les espèces sans moyen de déplacement actif sont réparties régulièrement dans toute la profondeur pendant un laps de temps prolongé. Les nageurs se maintiennent dans des zones stratifiées et délimitées très distinctement.

Du point de vue méthodologique, on constate que le prélèvement à la bouteille permet de mettre en évidence des écarts absolus très petits, tels que chez la *Daphnia*:

0,25	individus	/50	ml	à	1	mètre
1,75	»	/50	»	»	3	mètres
8,50	»	/50	»	»	5	»
1,13	»	/50	»	»	7	»

La précision obtenue avec une seule prise n'est pas inférieure à celle résultant du dénombrement. Une bouteille est donc représentative pour le volume (ou la couche stratigraphique) dont elle a été prélevée, à l'intérieur des trois quarts d'heure de durée de la pêche.

V. CONCENTRATION ET CHAMBRES A DÉNOMBRER

V. 1. Méthodes de concentration indépendantes

Les deux principes selon lesquels les organismes en suspension sont séparés de leur milieu sont:

a) la filtration, retenant les organismes soit sur un filtre de soie à blûter (par exemple « Zürcher Filtertrichter »), soit sur une membrane d'ultrafiltration (Schmitz 1953), soit encore dans une couche de sable fin (méthode Sedgewick-Rafter, cf. Standard Methods 1955), et

b) la sédimentation par centrifugation ou par décantation (Utermoehl 1958). Dans la méthode de la sédimentation, les organismes à densité inférieure à celle de l'eau doivent être récoltés séparément (par exemple par filtration du liquide surnageant).

Les méthodes de mésofiltration, ultrafiltration et centrifugation ont été utilisées par différents auteurs qui en ont évalué la précision. Toutefois, une étude systématique

comparative est proposée ici d'une manière plus approfondie. La méthode de décantation en cylindre gradué est proposée et étudiée pour la première fois.

V. 1.1. *Filtration du mésoplancton : calcul des échantillons nécessaires à une précision donnée*

Le filtre en soie à blûter, par la dimension de ses mailles de 50 μ au minimum retient quantitativement le mésoplancton (> 50 μ selon NAUMANN 1931). Le nanno- et l'ultraplancton traversent partiellement le filet; celui-ci ne se colmate que très lentement et plusieurs litres d'eau peuvent être filtrés.

VOLLENWEIDER & WOLFF (1948) ont étudié cette méthode et constaté que « pour obtenir un coefficient de variation de la moyenne ($s_{\bar{x}}/\bar{x} = CV_{\bar{x}}$) de 12,5 %, 10 échantillons au moins sont à examiner »; les auteurs sous-entendent que les 10 échantillons de 1 litre proviennent d'un milieu à dispersion au hasard; en effet, le contrôle statistique de leurs dénombrements des 10 échantillons donne des $\chi^2 > \chi^2_{0,05}$ dans neuf cas sur dix.

Il est possible de calculer théoriquement le nombre d'échantillons nécessaires à une précision donnée: admettant que l'ensemble de base, dans lequel s'opèrent les prélèvements, est dispersé selon la distribution de Poisson, la variance est égale à la moyenne.

$$s^2 \cong \bar{x}$$

et

$$s^2_{\bar{x}} \cong \frac{\bar{x}}{n}$$

dont on obtient:

$$s_{\bar{x}} \cong \sqrt{\frac{\bar{x}}{n}}. \qquad (1)$$

Le coefficient de variation de la moyenne $CV_{\bar{x}}$ est alors

$$CV_{\bar{x}} = \frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} = \frac{1}{\sqrt{n.\bar{x}}}. \qquad (2)$$

La précision est définie par l'inverse de la variance:

$$\frac{1}{CV_{\bar{x}}} = \sqrt{n\bar{x}}.$$

La précision dépend donc uniquement de la moyenne $\bar{x}$ et du nombre n de répétitions de l'observation. Le nomogramme, planche I*a* (annexe III), illustre ces relations et

indique le coefficient de variation de la moyenne en fonction de la moyenne $\bar{x}$ et de différents nombres de répétitions n.

Si donc la répartition des organismes suit une loi de dispersion au hasard (distribution selon Poisson), ce qui peut être contrôlé au moyen du χ^2, la précision du dénombrement dépend de la densité des organismes dans la chambre à dénombrer, par conséquent, de la moyenne du dénombrement. Si l'on désire augmenter la précision, dans une population de faible densité, le nombre d'individus à dénombrer augmentera avec le carré de la précision.

Exemple : De 9 prélèvements successifs de 1 litre d'eau du lac à 10 mètres de profondeur, chaque litre est filtré suivant méthode n° 8 et compté en chambre Kolkwitz (tableau 9).

TABLEAU 9

χ^2variance, *Coefficient de variation de la moyenne* $CV_{\bar{x}}$ *et Coefficient de variation théorique* $\left(\frac{\sigma_{\bar{x}}}{\bar{x}} . 100\%\right)$ *de neuf prélèvements de 1 litre*

Prélèvement	*Nauplius*	*Diaptomus*	*Daphnia*	Total des Crustacés
1	9	2	2	13
2	8	3	0	11
3	3	1	1	5
4	4	0	1	5
5	6	2	2	10
6	3	1	2	6
7	4	2	3	9
8	4	1	1	6
9	2	2	0	4
Total . . .	43	14	12	69
Moyenne $\bar{x}$	4,78	1,56	1,33	7,67
χ^2variance	15,4	4,0	6,0	10,4
$p\ (\chi^2)$.	$\simeq 0{,}05$	$> 0{,}05$	$> 0{,}05$	$> 0{,}05$
$CV_{\bar{x}}$	16,7%	18,9%	25%	13,7%
Selon Poisson:				
$\frac{\sigma_{\bar{x}}}{\bar{x}} . 100\% = CV_{\bar{x}}$	15,2%	26,7%	28,9%	12,0%

Quoique provenant du même ensemble de base, les coefficients de variation diffèrent en diminuant avec une moyenne qui augmente. Dans cet exemple, comme dans celui de VOLLENWEIDER & WOLFF (1948), la distribution des organismes se révèle être fortuite et la précision désirée peut être prévue à l'avance. A l'exception des valeurs des *Nauplius* qui présentent une variabilité inférieure à la variabilité théorique, les coefficients de variation observés et théoriques se ressemblent beau-

coup. Si les organismes étaient répartis irrégulièrement en bancs, nuages, agglomérations ou tout autre complexe, la variance s'élèverait rapidement au-dessus de la moyenne $s^2 > \bar{x}$, et la précision obtenue par le dénombrement serait imprévisible. Pour l'organisation d'une expérience, le contrôle préalable de la dispersion de l'ensemble de base permet de prévoir l'étendue nécessaire pour une précision désirée.

Prenons l'exemple donné par VOLLENWEIDER & WOLFF (1948, p. 256). Le calcul effectué sur leurs comptages donne les résultats résumés dans le tableau 10.

TABLEAU 10

Analyse des distributions de fréquences parmi les dix prélèvements effectués par VOLLENWEIDER ET WOLFF *(1948)*

	Diaptomus	*Daphnia I*	*Daphnia II*
Moyenne $\bar{x}$ de dix prélèvements . . .	19,7/litre	11,9/litre	4,10/litre
χ^2variance	20,1	10,6	8,51
$p\ (\chi^2)$	$\simeq 0{,}01$	$> 0{,}05$	$> 0{,}05$
$CV_{\bar{x}}$	10,7 %	12,6 %	15,1 %
selon Poisson: $CV_{\bar{x}}$	7,1 %	9,2 %	15,6 %

Le χ^2 révèle un désaccord entre la répartition théorique de Poisson et celle réalisée par *Diaptomus*; aussi le $CV_{\bar{x}}$ est-il de moitié plus élevé que le coefficient théorique.

En concluant nous constatons que le nombre de répétitions n ou le coefficient de variation $CV_{\bar{x}}$, fournis par la loi de Poisson peuvent être déterminés théoriquement. Toutefois, ils représentent en général un minimum qui, suivant la dispersion plus ou moins fortuite des organismes, offre une base de travail (Planche Ia).

Du point de vue pratique, le filtre en soie à blûter est qualifié pour la récolte du mésoplancton.

V. 1.2. *Filtration du mésoplancton : l'erreur introduite par le prélèvement et la préparation*

La méthode de filtration par soie à blûter est appréciée à cause de la rapidité de la préparation et la possibilité d'étudier de grands volumes d'eau à faible densité (par exemple pour Crustacés planctoniques ou Diatomées à grandes colonies, etc.). Pour évaluer dans cette méthode l'erreur introduite par la préparation de la chambre à dénombrer, l'expérience suivante est disposée: 3 prélèvements d'eau du lac de 1 litre, prélevés au même endroit, sont filtrés suivant le procédé n° 8; de chaque filtrat, complété à 100 ml, 3 échantillons de 8 ml sont centrifugés et dénombrés ne

entier dans la chambre Kolkwitz. Organismes dénombrés: *Ceratium hirundinella* (nombre d'individus), *Fragilaria crotonensis*, *Dinobryon sociale*, *Tabellaria fenestrata* (nombre de colonies), (tableau 11.1).

TABLEAU 11.1

Nombre d'individus, ou de colonies, se trouvant dans 80 ml de suspension dans trois prélèvements

Prélèvement	Echantillon n°	*Ceratium*	*Fragilaria*	*Dinobryon*	*Tabellaria*
1	1.1	113	97	43	63
	1.2	124	104	34	77
	1.3	125	105	42	98
2	2.1	113	85	54	95
	2.2	113	103	47	83
	2.3	113	110	45	87
3	3.1	48	61	37	53
	3.2	136	87	36	67
	3.3	100	87	42	77

TABLEAU 11.2

Analyse de variance des valeurs de tableau 11.1

Source de variance	*DL*	*SC*	Variance
Prélèvements	2	2370,1	1185,1
Espèces	3	22251,0	7417,0
Interaction } Echantillons	6 } 30	680,1 } 6604,8	113,4 } 220,2
Reste } Echantillons	24 } 30	5924,7 } 6604,8	246,9 } 220,2
Total	35	31225,9	

L'analyse de variance (tableau 11.2) indique ceci:

1° Absence d'interaction entre prélèvements et espèces;

2° La variance « entre espèces » est beaucoup plus élevée que celle entre les trois échantillons à l'intérieur de chaque prélèvement: $F = 30{,}05$ avec $p < 0{,}001$.

L'abondance spécifique est donc facilement mise en évidence. Même les deux espèces

dont les densités se rapprochent (*Tabellaria* avec 77,8 colonies/80 ml et *Fragilaria* avec 93,2 colonies/80 ml) sont nettement distinctes:

Tabellaria : $\bar{x} = 77{,}8 \pm 9{,}3 \quad (= \pm 1{,}96\, s_{\bar{x}})$
Fragilaria : $\bar{x} = 93{,}2 \pm 10{,}4 \quad (= \pm 1{,}96\, s_{\bar{x}})$
Différence: $t = 3{,}53$ avec $p < 0{,}01$;

3° Entre prélèvements, il existe une différence significative également:

$$F = \frac{1185{,}1}{246{,}9} = 11{,}82 \quad \text{avec} \quad p < 0{,}001 \,.$$

Le prélèvement n° 3 présente des valeurs inférieures.

Cette analyse montre, sans connaître encore la précision des déterminations avec la chambre Kolkwitz, que la méthode d'échantillonnage et de préparation de la chambre fournit des valeurs dont la variance ne dépasse pas celle des prélèvements.

V. 1.3. *Ultrafiltration*

La méthode bactériologique de l'ultrafiltration est utilisée en limnologie à cause de la précision élevée qu'elle peut fournir et à cause de la possibilité de conserver les préparations dénombrées. SCHMITZ (1953) obtient sur le filtre à membrane une répartition des organismes qui permet de trouver un $CV_{\bar{x}}$ inférieur à 10% pour une moyenne de $\bar{x} = 127{,}7$. La méthode proposée par JANNASCH (1953) consiste à éclaircir la membrane et à compter les organismes sur la membrane même. Toutefois, le procédé d'éclaircissement et de montage de la membrane détruit toute substance organique, de sorte que la méthode est limitée aux Diatomées, dont les carapaces siliceuses résistent au traitement. DIETERICH & STEINECKE (1955) préconisent le rinçage du filtre de façon à récolter les organismes dans un petit volume d'eau. JAVORNICKY (1958) constate cependant que les pertes sont considérables avec cette méthode. A l'intérieur des préparations, DIETERICH & STEINECKE (1955) déterminent une variance qui en réalité indique la qualité de la dispersion des organismes dans la chambre Sedgewick-Rafter. Le coefficient de variation de leurs résultats

$$CV_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{0{,}408^2}{10}} = 13\,\% \quad \text{pour} \quad \bar{x} = 16{,}7\,,$$

et

$$CV_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{0{,}362^2}{10}} = 12{,}4\,\% \quad \text{pour} \quad \bar{x} = 18{,}6\,,$$

dans dix champs d'observation, est un peu plus élevé que le $CV_{\bar{x}}$ théorique selon Poisson à l'intérieur des chambres (cf. § V. 2.1). L'erreur due à la filtration, décelable par des répétitions, n'est pas indiquée.

Dans la variance entre ultrafiltrations entrent les erreurs de pipetage et les éventuelles pertes pendant l'inclusion à l'alcool benzylique et le montage au baume. Cette erreur est à séparer de la variance à l'intérieur d'une préparation qui est une mesure de la répartition des organismes sur la membrane même.

Exemple 1

Dénombrement de quatre membranes filtrantes préparées avec un échantillon de la même suspension de plancton: filtration de 20 ml. La surface entière de la membrane est divisée en millimètres carrés; le filtre entier = 330 mm², dont 300 mm² entiers, dans lesquels les *Synedra ulna* sont dénombrés (cf. tableau 12.1).

TABLEAU 12.1

Dénombrement de Synedra ulna *sur filtre à membrane :*

x_i = *nombre d'individus/mm² du réseau*
f = *fréquence des* x_i
fx_i = *nombre total d'individus*

Préparation	1		2		3		4	
x_i	f	fx_i	f	fx_i	f	fx_i	f	fx_i
0	21	0	14	0	22	0	30	0
1	57	57	58	58	53	53	59	59
2	74	148	81	162	73	146	67	134
3	51	153	62	186	67	201	66	198
4	44	176	48	192	43	172	33	132
5	30	150	19	95	27	135	23	115
6	13	78	9	54	10	60	14	84
7	4	28	6	42	3	21	7	49
8	4	32	2	16	1	8	1	8
9	1	9	1	9	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—
11	1	11	—	—	1	11	—	—
Total . .	300	842	300	814	300	807	300	779

Par l'analyse des résultats, nous trouvons que dans la répartition des organismes sur la membrane, deux des quatre préparations (tableau 12.2) présentent un χ^2_{variance} dont la valeur excède le $\chi^2_{0,05}$. Toutefois l'excédent n'est pas énorme et nous nous permettons d'accepter une telle dispersion comme « suffisamment normale »

TABLEAU 12.2

Analyse de variance du dénombrement tableau 12.1

Variance entre	*DL*	*SC*	Variance
Préparations	3	1,29	0,4308
Carrés du réseau	1196	3654,50	3,0556
Total	1199	3655,79	

TABLEAU 12.3

Contrôle de la dispersion des individus sur la membrane

Préparation	Total	$\chi^2_{var.}$	$\chi^2_{0,05}$	$\bar{x}$	$CV_{\bar{x}}$	($CV_{\bar{x}}$ pour 10 mm²)
1	842	365,1*	348,9	2,807	3,81 %	20,9 %
2	814	288,0	348,9	2,713	3,44 %	18,9 %
3	807	310,8	348,9	2,690	3,59 %	19,7 %
4	779	389,8*	348,9	2,597	4,09 %	22,4 %

* = écarts "significatifs"

(cf. § VI. 2.1). Le comptage dans trois cents carrés conduit à une précision élevée, indiquée par un $CV_{\bar{x}}$ qui reste au-dessous des 4 %. En ne comptant que 10 mm², on aurait trouvé des $CV_{\bar{x}}$ autour des 20 %, ce qui correspond grosso modo aux valeurs théoriques de la planche I*a*, et aux valeurs trouvées par SCHMITZ (1953). La moyenne par carré sur tous les dénombrements $\bar{x} = 2{,}702$. La variance entre les préparations différentes, due à la filtration et au montage, est égale au *CM* « entre préparations » de l'analyse de variance 12.2. Cette valeur n'est d'aucune façon plus élevée que la variance à l'intérieur des préparations entre carrés du réseau. Le coefficient de variation de la moyenne entre préparations

$$CV_{\bar{x}}\,(\text{prép.}) = \sqrt{\frac{0{,}4308}{4}} \,/\, \bar{x} = 12{,}14\,\%\,.$$

Pour une seule préparation, ceci représente un coefficient

$$CV\,(\text{prép.}) = 24{,}29\,\%\,, \qquad \text{avec} \qquad \bar{x} = 2{,}70.$$

En conclusion, nous constatons qu'une seule préparation d'une membrane filtrante fournit une valeur moyenne d'organismes par unité de surface dont la pré-

cision dépend uniquement du nombre d'unités de surface dénombrées. S'il faut, dans l'évaluation de la *vraie* valeur moyenne, tenir compte de l'erreur introduite par la technique de préparation, elle ne dépasse pas l'erreur du dénombrement même dans le cas étudié.

Exemple 2

La densité des organismes sur la membrane filtrante dépend de la quantité de suspension filtrée. Une trop forte densité peut augmenter l'erreur du dénombrement par la superposition de plusieurs individus. Néanmoins, les limites de densité sont assez larges, ce qui a été démontré par l'expérience suivante.

Quatre membranes sont préparées avec 1 ml, 2 ml, 4 ml et 8 ml d'un même échantillon; cette série est répétée quatre fois, toujours avec le même échantillon d'eau. Le résultat du dénombrement des colonies de *Fragilaria crotonensis*, multiplié par le nombre moyen d'individus par colonie est résumé dans le tableau 13.1.

TABLEAU 13.1

Nombre de cellules de Fragilaria crotonensis *par millilitre*
Filtration de volumes différents

Série	1	2	3	4	Total
Filtration de 1 ml	394	216	182	340	1032
2 ml	261	235	349	346	1191
4 ml	275	223	316	298	1112
8 ml	278	270	272	306	1226
Total	1208	944	1119	1290	4561

TABLEAU 13.2

Analyse de variance des valeurs du tableau 13.1

Source de variance	*DL*	*SC*	Variance
Filtrations	3	5611	1870
Séries	3	16495	5498
Reste	9	25021	2780
Total	15	47127	

Ni les séries, ni les filtrations ne présentent des différences significatives de variation:

$$F\ (\text{séries}) = 1{,}978 \qquad p \simeq 0{,}25$$
$$F\ (\text{filtr.}) = 0{,}673 \qquad p \simeq 0{,}5\ .$$

Les seize valeurs sont donc issues du même ensemble de base et la variance totale peut être évaluée par

$$s^2 = \frac{47127}{15} = 3141{,}8\ .$$

La moyenne générale de cellules par membrane $\bar{x} = 285{,}06$.

Le coefficient de variation de la moyenne

$$CV_{\bar{x}} = 4{,}91\,\%$$

pour les seize dénombrements.

Pour une seule préparation, il faudrait tenir compte d'une erreur de CV (prép.) $= 19{,}6\,\%$.

La quantité filtrée, et avec elle la densité des organismes sur le filtre, peut varier de 1 à 8 ml sans influencer le résultat.

V. 1.4. *Centrifugation*

La concentration par centrifugation des organismes vivants ou fixés, a fait l'objet de plusieurs études détaillées (BALLANTINE 1953, JAVORNICKY 1956 et 1958' HARTMAN 1958, SCHMIDT-RIES 1936, LITTLEFORD et al. 1940, etc.); il est connu que la reproductibilité des centrifugations varie fortement en fonction des dimensions et des qualités des organismes à examiner, en fonction du temps et des vitesses de centrifugation et en fonction de l'appareil utilisé. Chaque centrifugeuse et chaque méthode de concentration par centrifugation doivent être testées au préalable. Les critères qui en résultent ne sont que rarement valables dans d'autres conditions. Donner ici un tableau des variances trouvées dans nos conditions n'aurait qu'une valeur de démonstration. Nous nous bornons donc à donner un exemple de détermination de la variabilité entre des centrifugations répétées.

Pour dévoiler les défauts de la méthode, on procède au dénombrement d'un organisme lourd et facilement identifiable; ce choix vise à éliminer des dénombrements faits sur des espèces susceptibles d'engendrer beaucoup d'erreurs, par exemple état cénobial, effritement des individus, confusion avec d'autres espèces, etc. Les résultats du dénombrement de *Ceratium hirundinella* dans la chambre Sedgewick-Rafter (chambre entière), préparée huit fois avec 1 ml de suspension provenant de la centrifugation de 15 ml d'eau du lac, concentrée à 1,5 ml, sont donnés dans le tableau 14:

TABLEAU 14

Nombre de Ceratium hirundinella *trouvé dans la chambre Sedgewick-Rafter après centrifugation de huit échantillons d'une même suspension*

Centrifugation n°:	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de *Ceratium*	44	44	41	28	43	48	39	51

$\bar{x}$ = 42,25 *Ceratium*/10 ml $s_{\bar{x}}$ = 2,43
s^2 = 47,357 $CV_{\bar{x}}$ = 5,75 % (pour huit répétitions)

En comparant ce résultat de $CV_{\bar{x}}$ avec les valeurs théoriques de la planche I*a*, on remarque que la méthode utilisée présente une variabilité qui n'excède pas la valeur théorique. La méthode ne comporte donc pas d'erreur de principe, et une variance plus grande sera due, soit à la destruction irrégulière des colonies, soit à la récupération non quantitative de certaines espèces délicates.

V. 1.5. *Décantation*

UTERMOEHL, dans ses chambres tubulaires et chambre combinée, concentre les organismes directement sur le fond de la chambre par la sédimentation. Le même principe, faisant appel à la pesanteur des organismes, peut être utilisé pour concentrer les organismes dans une éprouvette graduée aux fins d'un dénombrement en chambre Sedgewick-Rafter ou Kolkwitz. Après 16 à 24 heures de sédimentation, le liquide surnageant est éliminé à l'aide d'un siphon relié à une trompe à vide (cf. § I. 2.6). Cette méthode est moins brutale que la centrifugation et elle fournit de très bons résultats.

TABLEAU 15

Dénombrement de six espèces dans la chambre Kolkwitz après concentration par décantation (nombre de colonies/50 ml)

Décantation	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	$CV_{\bar{x}}$
Espèce:								
Fragilaria (colonies) . .	557	463	372	401	424	357	429,0	6,97 %
Asterionella (colonies) . .	173	176	200	147	182	154	172,0	4,57 %
Melosira (filaments) . .	5	9	5	5	5	5	5,7	12,7 %
Tabellaria (colonies) . .	5	2	3	3	8	4	4,2	20.9 %
Dinobryon (colonies) . .	14	25	12	11	17	13	15,3	13,8 %
Eudorina (cénobes) . .	15	6	10	16	7	9	10,5	16,1 %

Le tableau 15 résume les résultats de six décantations faites avec 100 ml d'une suspension d'eau du lac; du volume réduit à 2 ml (en deux étapes), 1 ml est compté en entier dans la chambre Kolkwitz.

Les coefficients de variation de la moyenne $CV_{\bar{x}}$ sont tous comparables aux valeurs théoriques de la planche I*a* pour six répétitions, à l'exception des *Fragilaria* qui présentent une variabilité trop élevée (cf. § III. 3).

La méthode de la décantation présente l'avantage de ne pas limiter le volume à examiner: il suffit de choisir l'éprouvette graduée de dimensions nécessaires. Dans une grande éprouvette toutefois, la graduation n'est pas suffisamment précise pour permettre une réduction correcte à un très petit volume. La préparation peut alors être faite en deux étapes: par exemple première sédimentation de 1 litre pendant 48 heures; réduction du volume à 100 ml. Remise en suspension et à nouveau sédimentation dans une éprouvette plus étroite. Plus l'éprouvette est étroite, plus la réduction du volume est précise; par contre, le temps de sédimentation sera long.

En conclusion: la méthode de la décantation fournit des résultats reproductibles et est à conseiller dans les cas où la centrifugation risque d'être trop brutale. Dans le § V. 3 nous verrons que la variabilité de la méthode est inférieure à celle de la centrifugation, c'est-à-dire les résultats sont plus précis.

V. 2. Chambres a dénombrer

Parmi les nombreux modèles de chambres à dénombrer on peut distinguer deux sortes:

a) les chambres où une concentration préalable est nécessaire (à l'exception des suspensions très denses): chambre Kolkwitz, chambre à plaques selon Utermoehl, chambre selon Sedgewick-Rafter, hémacytomètre, etc.;

b) les chambres dans lesquelles la concentration s'opère directement et que l'on remplit avec un échantillon non concentré d'eau: chambre tubulaire selon Utermoehl, chambre combinée selon Utermoehl.

La précision des dénombrements dans les chambres mentionnées sous *a)* dépend des techniques de remplissage; un volume inexact ou un dépôt irrégulier ou incomplet sont les principales sources d'erreur. Ces erreurs ont été étudiées en détail par Littleford et al. (1940) pour la chambre Sedgewick-Rafter. La reproductibilité des comptages en chambre Kolkwitz ou en chambre à plaques Utermoehl a déjà été faite. Ces études méritent pourtant le reproche suivant: l'analyse se rapporte à deux opérations (concentration et remplissage) qui n'ont pas été séparées. En conséquence, l'on ignore si l'erreur est imputable à l'une ou à l'autre de ces opérations. Le paragraphe suivant est consacré à la reproductibilité du remplissage. Lund, Kipling & Le Cren (1958)

remarquent justement que l'utilisation de l'hémacytomètre est rarement indiquée à cause de la hauteur insuffisante de la chambre.

V. 2. 1. *Chambre Sedgewick-Rafter*

LITTLEFORD, NEWCOMBE & SHEPHERD (1940) présentent une expérience dans laquelle sept chambres préparées avec la même suspension concentrée sont dénombrées; ceci est répété avec quatre suspensions différentes. Leurs résultats sont rappelés dans le tableau 16.1.

TABLEAU 16.1

Dénombrements en chambre Sedgewick-Rafter, effectués par LITTLEFORD et al. (1940)

Suspension	I	II	III	IV
Chambre 1	629	589	474	526
2	503	651	543	549
3	594	526	520	457
4	577	543	497	474
5	577	491	257	440
6	601	429	549	354
7	539	617	549	554
Total	4020	3846	3389	3354
$\bar{x}$	574,3	549,4	484,1	479,1
χ^2	14,89	63,63	134,32	63,43

TABLEAU 16.2

Analyse de variance des valeurs de tableau 16.1

Source de variance	*DL*	*SC*	Variance	
Suspensions	3	47.290,4	15.763,5	$F = 2{,}68$
Chambres	24	140.806,9	5.866,9	
Total	27	188.097,3		

Les différences entre les suspensions I-IV ne sont pas significatives ($F = 2{,}68$; $F_{0,05} = 3{,}01$). Nous pouvons donc prendre le *CM* entre chambres comme mesure

générale de la variance entre chambres et déterminer un $\bar{x} = 521{,}75$ comme moyenne générale.

Cette variance entre les différentes préparations de chambres est assez élevée: 5.866,9 pour une moyenne de 521,75. Les χ^2 (variance) déterminés à l'intérieur de chaque suspension sont de ce fait considérables et dépassent largement les limites du $\chi^2_{0,05} = 12{,}59$. Toutefois, les moyennes sont si élevées qu'il est discutable si le χ^2_{variance} est encore valable (cf. § VI. 2.1). En calculant le coefficient de variation de la moyenne on obtient

$$CV_{\bar{x}} = 2{,}77\,\% \text{ de la moyenne } \bar{x} = 521{,}75 \text{ pour 28 répétitions;}$$

cette valeur est beaucoup plus élevée que la valeur théorique et nous indique que, outre la variation normale entre plusieurs prélèvements pris au hasard dans une suspension, la technique de préparation de la chambre introduit une erreur supplémentaire. GILBERT (1942) analyse ce « filling error » ou erreur de remplissage et réussit à l'éliminer par une meilleure technique de préparation de la chambre (cf. STANDARD METHODS 1955).

V. 2.2. *Chambre combinée selon Utermoehl*

L'avantage de la chambre combinant la concentration et le remplissage consiste surtout en un gain de temps. Du point de vue précision, l'avantage n'est réel qu'au moment où la variance de la méthode combinée est inférieure à la somme des variances dues à la concentration et à la préparation de la chambre.

La variabilité de la méthode en chambre combinée a été évaluée à l'aide des valeurs consignées dans les tableaux 6 et 8.

a) L'analyse de variance de l'exemple du tableau 6.2 présente une variance entre préparations de la chambre combinée, à partir de la même suspension, qui est égale au « CM entre sédiments »,

$$s^2_{(\text{préparations})} = 79{,}46 \text{ avec une moyenne } \bar{x} = 98{,}4$$

(= résultats du dénombrement de filaments de *Mélosira islandica* dans 50 ml). Douze sédimentations en chambre combinée ont été faites et le coefficient de variation de la moyenne est estimé à

$$CV_{\bar{x}} = 2{,}62\,\% \,.$$

ce qui s'accorde avec la variance théorique (planche I*a*).

b) L'analyse de variance de l'exemple § IV. 2.2 fournit une « variance entre dénombrements » qui correspond à la part de la variance totale due à la préparation

de la chambre à dénombrer. Cette variance dépend de l'espèce dénombrée. Elle est calculée avec seize paires d'observations pour chaque espèce (tableau 17).

Comme nous l'avons vu au § V. 1, la variance dépend de la fréquence des organismes dénombrés. Pour obtenir une reproductibilité suffisante, il faut que la densité soit suffisamment élevée. En comparant les valeurs du *CV* avec les *CV* théoriques que fournit la planche I*a*, on observe que la variance trouvée est toujours un peu plus grande que la valeur théorique; la variabilité entre les chambres n'est donc pas seulement le résultat d'une variabilité due au hasard, mais d'une technique de remplissage et de préparation qui introduit des erreurs supplémentaires.

TABLEAU 17

Variance entre dénombrements dans seize préparations de la chambre combinée
(cf. tableau 8.2)

Espèce	*CM*	*s*	$\bar{x}$	*CV*	1,96*s*	2*CV*
Ceratium	10,44	3,23	7,06	45,7 %	6,33	90,4 %
Codonella *	96,91	(9,84)	(46,7)			
Asterionella	148,7	12,19	85,4	14,3 %	23,89	28,6 %
Fragilaria	42,88	6,55	29,8	22,0 %	12,84	44,0 %
Melosira	40,19	6,34	16,5	39,4 %	12,43	76,8 %
Tabellaria	1,281	1,13	1,41	80,1 %	2,21	160,2 %
Gemellicystis	9,03	3,01	5,91	50,9 %	5,90	101,8 %
Daphnia *	3,78	(1,94)	(2,91)			

* *Codonella lacustris* et *Daphnia hyalina* présentent des différences significatives de densité entre profondeurs. Une moyenne générale, ainsi qu'une variance générale ne peuvent pas être déterminées; la variance entre préparations varie selon la densité de la couche.

V. 3. COMPARAISON DES CHAMBRES ET DES MÉTHODES DE CONCENTRATION: MÉTHODES COMBINÉES

Chaque méthode de dénombrement fournit des résultats reproductibles avec une précision typique. Toutefois, la valeur absolue du résultat peut être systématiquement aberrante par suite d'un défaut de principe de la méthode. Il est donc nécessaire de comparer les résultats du dénombrement d'une même suspension fournis par différentes chambres et différentes méthodes de concentration.

Techniquement, il est très difficile de préparer les différentes chambres à dénombrer de façon à obtenir une densité égale avec toutes les chambres. Il est plus aisé de convertir les résultats fournis par chaque méthode en une mesure commune et comparable. Il est clair que cette transformation purement théorique peut introduire de nouvelles erreurs par des facteurs de conversion incorrects.

A l'intérieur de chaque méthode de dénombrement, la reproductibilité peut être examinée directement sur les résultats du dénombrement. Pour la comparaison des différentes méthodes de dénombrement, il faut exprimer les valeurs soit en nombre d'organismes par unité de volume d'eau (par exemple nombre de *Synedra*/ml), soit en volume d'eau par unité d'organismes (par exemple nombre de millilitres qu'occupent 100 *Synedra*). Nous traiterons les problèmes en relation avec la transformation des résultats au § VI. Pour l'exemple présent, nous avons choisi comme base commune: le nombre d'individus/ml.

Le tableau 18 montre les combinaisons de cinq méthodes différentes de dénombrement avec quatre méthodes différentes de concentration:

Types de concentration :

I = sédimentation dans les chambres combinées ou chambres tubulaires selon Utermoehl,
II = sédimentation dans éprouvette graduée avec décantation,
III = centrifugation avec décantation,
IV = ultrafiltration par filtre à membrane.

Types de dénombrement :

A = dans la chambre tubulaire Utermoehl (25 ml) sur microscope renversé *(MR)*,
B = dans la chambre à plaques sur microscope renversé *(MR)*,
C = dans la chambre à plaques sur microscope normal *(MN)*,
D = dans la chambre Sedgewick-Rafter *(MN)*,
E = sur le filtre à membrane éclairci.

TABLEAU 18

Combinaisons des méthodes de concentration et des méthodes de dénombrement.
(Les indices renvoient aux techniques décrites au § II.2. Un — indique une combinaison impossible)

Concentration:	*I*	*II*	*III*	*IV*
Dénombrement *A*	4) *MR*	—	—	—
B	5) *MR*	6), 9) *MR*	7), 9) *MR*	—
C	5) *MN*	6), 9) *MN*	7), 9) *MN*	—
D	5), 10) *MN*	6), 10) *MN*	7), 10) *MN*	—
E	—	—	—	11) *MN*

TABLEAU 19.1

Nombre de Synedra ulna/*millilitre d'un même prélèvement, déterminé à l'aide de différents types de concentration et de dénombrement*

Types de concentration	SÉDIMENTATION			FILTRATION
Types de dénombrement	*I* Utermoehl	*II* Cylindre gradué	*III* Centrifugation	*IV* à membrane
A Chambre tubulaire, Microscope renversé	46,14 46,88 45,43 47,36 $\bar{x}$ = 46,45 s = 0,826 CV = 1,8%	—	—	—
B Chambre combinée ou à plaques, Microscope renversé	45,30 39,18 38,66 45,39 $\bar{x}$ = 42,13 s = 3,72 CV = 8,81%	40,64 46,14 50,62 53,36 $\bar{x}$ = 47,69 s = 5,56 CV = 11,7%	37,17 44,48 55,64 45,64 $\bar{x}$ = 45,73 s = 7,59 CV = 16,6%	—
C Chambre combinée ou à plaques, Microscope normal	49,88 51,95 44,02 55,48 $\bar{x}$ = 50,33 s = 4,80 CV = 9,5%	64,10 65,59 57,89 58,34 $\bar{x}$ = 61,48 s = 3,94 CV = 6,4%	51,00 72,27 87,24 54,75 $\bar{x}$ = 66,31 s = 18,27 CV = 27,6%	—
D Chambre Sedgewick- Rafter, Microscope normal	51,26 50,34 50,87 51,78 $\bar{x}$ = 51,06 s = 0,28 CV = 0,56%	45,51 47,07 41,14 49,22 $\bar{x}$ = 45,73 s = 3,42 CV = 7,5%	41,71 58,97 49,94 46,58 $\bar{x}$ = 49,30 s = 7,28 CV = 14,8%	—
E sur membrane	—	—	—	47,68 44,91 41,65 41,07 $\bar{x}$ = 43,83 s = 3,07 CV = 7,0%

La combinaison I-*D* s'effectue comme suit: sédimentation dans la chambre combinée; enlever le liquide surnageant selon Utermoehl; mélanger le contenu de la chambre à plaques et en prélever 1 ml pour la chambre Sedgewick-Rafter. Pratiquement, cette méthode paraît sans utilité. Elle a été effectuée ici à titre de contrôle, mais elle présente l'avantage, en pratique, de travailler avec la chambre Sedgewick-Rafter plus plate, sans avoir recours à une décantation par aspiration.

Afin de connaître la précision de chaque combinaison, chacune est répétée quatre fois. La suspension de base, destinée à ces divers dénombrements, est fournie par une pêche de 5 litres d'eau du lac (pêche du 14.3.61); les 5 litres sont soigneusement brassés dans un grand récipient, répartis en 18 flacons d'échantillon, et fixés immédiatement. Pour cette analyse, il nous fallait un organisme unicellulaire suffisamment fréquent, susceptible d'être compté sous l'objectif n° 3 au microscope normal, d'un poids permettant une sédimentation complète, et déterminable avec certitude. Nous avons choisi la Diatomée *Synedra ulna*, qui est aussi dénombrable sur le filtre à membrane. Suivant les principes discutés au § VII. 2, le nombre d'individus à dénombrer dans chaque préparation est fixé à 400 (tableau 19.1).

L'analyse de variance (tableau 19.2) sur les groupes *B*, *C* et *D* permet de mettre en évidence d'une part l'influence de la méthode de concentration, et d'autre part l'influence de la méthode de dénombrement. Les groupes *A* et *E* échappent *de facto* à cette analyse.

TABLEAU 19.2

Analyse de variance des dénombrements de Synedra ulna *avec trois méthodes de concentration et trois méthodes de dénombrement* (tableau 19.1)

Source de variance	*DL*	*SC*	*CM* = Variance
Types de concentration	2	217,11	108,56
Types de dénombrement	2	1310,88	655,44
Interaction	4	442,83	110,71
Reste	27	1459,73	54,06
Total	35	3430,55	

En premier lieu, nous constatons qu'il n'existe pas d'interaction entre concentration et dénombrement:

$$F_{\text{interaction}} = 2{,}05 \quad (F_{0{,}05} = 2{,}78) \; .$$

Nous pouvons ainsi former une variance restante qui aura la forme suivante:

TABLEAU 19.3

Analyse de la variance restante du tableau 19.2

Source de variance	*DL*	*SC*	*CM*
Intérieure à chaque méthode:			
Interaction, Reste	31	1902,56	63,17

De cette deuxième analyse nous concluons que la méthode de concentration ne provoque pas de différences significatives entre les résultats, puisque

$$F_{\text{concentrations}} = 1{,}719 \quad (F_{0{,}05} = 3{,}3)\ .$$

Par contre, la méthode de dénombrement, c'est-à-dire la chambre et le type de microscope utilisés, exercent une influence qui change significativement le résultat du dénombrement:

$$F_{\text{dénombrement}} = 10{,}38 \quad (F_{0{,}05} = 3{,}3)\ .$$

Les moyennes fournies par chaque méthode de dénombrement pour l'ensemble des trois méthodes de concentration sont respectivement:

Méthode *B* (chambre à plaques, micr. renv.) $\bar{x} = 45{,}18$ *Synedra*/ml
» *C* (chambre à plaques, micr. norm.) $\bar{x} = 59{,}38$ »
» *D* (chambre Sedgewick-Rafter, micr. norm.) $\bar{x} = 48{,}70$ »

Les différences entre ces moyennes $\bar{x}$ peuvent être examinées par paires au moyen du test de Student:

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s} \sqrt{\frac{N}{2}}\ ,$$

où $s = CM$ reste $= \sqrt{63{,}12} = 7{,}95$.

TABLEAU 19.4

Comparaison des moyennes obtenues par différentes méthodes de dénombrement
(cf. tableau 19.1)

Différences entre méthodes	t	$t_{0{,}05}$	*DL*	Différence
B et *C*	4,37	2,07	22	significative
B et *D*	1,08	2,07	22	non-significative
C et *D*	3,29	2,07	22	significative

Les résultats obtenus par dénombrement en chambre à plaques avec le microscope normal (C) sont significativement plus élevés que les résultats obtenus par les autres méthodes.

Avec ce même test de t (où $s^2 = (s_1^2 + s_2^2)/2$, pour $N_1 = N_2$) nous pouvons encore comparer les résultats fournis par la méthode de la chambre tubulaire avec le microscope renversé (A) et ceux de la méthode de l'ultrafiltration, (E) avec les résultats des autres méthodes:

TABLEAU 19.5

Comparaison des moyennes obtenues par dénombrement en chambre tubulaire (A, I), en chambre combinée (B, I) et par ultrafiltration (E, IV)

Différences entre	t	$t_{0,05}$	DL	Différence
A I et *B I*	2,27	2,45	6	non-significative
B I et *E IV*	0,703	2,45	6	non-significative

Les résultats obtenus en chambre tubulaire et les résultats obtenus sur l'ultrafiltre ne diffèrent pas des résultats de la chambre combinée sur le microscope renversé.

Examinons maintenant l'influence des types de dénombrement et de concentration:

a) *Différences des résultats suivant le type de dénombrement.*

Du point de vue statistique, l'analyse de variance et le test de Student établissent une différence significative des résultats du groupe C; c'est-à-dire le dénombrement en chambre à plaques avec le microscope normal a donné un nombre plus élevé d'organismes par unité de volume. Par contre, les résultats obtenus par la chambre à plaques sur le microscope renversé (méth. B) sont en accord avec les dénombrements dans la chambre Sedgewick-Rafter sur microscope normal.

Du point de vue pratique, l'unique différence entre méthode B et méthode C est le microscope utilisé: renversé ou normal. Pour l'interprétation de cet écart, il faudrait discerner celle de ces valeurs qui se rapproche de la réalité. Des difficultés optiques ou des erreurs de détermination peuvent fausser un dénombrement: une Diatomée vidée, aussi fine que la *Synedra*, sans protoplasme colorable, pourrait échapper à l'observation. Une observation trop hâtive pourrait confondre des individus isolés d'*Asterionella* ou de *Fragilaria* avec les aiguilles des *Synedra ulna*. La confusion est facile avec l'emploi du microscope normal (couche épaisse de liquide); elle est moins probable avec l'emploi du microscope renversé (couche minime de liquide).

Il est évident que dans ces divers cas, la vraie valeur moyenne est inconnue, et il n'est pas possible de la déterminer. Si l'on juge l'écart des méthodes sans importance, dans certains problèmes de dynamique des populations, il existe cependant d'autres cas où une augmentation de 30% (méthode $C = 130\%$ de B) présente un intérêt déjà particulier. Pour une méthode donnée, il est possible d'établir des fréquences relatives; par contre la comparaison des valeurs obtenues par différentes méthodes, ou même par différents investigateurs, ne travaillant pas dans le même laboratoire, est à apprécier avec précautions: les différences réelles peuvent être accentuées ou réduites par le choix des méthodes.

b) *Influence du type de concentration sur les résultats*

L'analyse de variance (tabl. 19.2) ne révèle pas de différence significative entre les résultats fournis par les différentes manières de concentrer l'échantillon. Les moyennes fournies par chaque méthode sont pratiquement les mêmes. Par contre, si l'on examine la variance entre les dénombrements à l'intérieur de chaque groupe (combinaison de dénombrement et de concentration) on voit immédiatement (cf. tabl. 19.1) qu'elle varie beaucoup d'une méthode à l'autre.

La variance entre dénombrements, préparés avec la méthode de la centrifugation, est beaucoup plus importante que la variance à l'intérieur des méthodes préparées avec le procédé d'Utermoehl, ou la décantation. Cette dissemblance des variances se maintient parmi les différentes méthodes de dénombrement. Elle est mise en évidence par les coefficients de variation *CV* que nous sommes autorisés à comparer, puisqu'ils se basent sur une moyenne générale identique et sur un même nombre de répétitions (tabl. 19.6).

TABLEAU 19.6

Coefficient de variation d'un dénombrement, à l'intérieur de différentes méthodes de concentration, soit « précision de la méthode de concentration »

Méthode de concentration	*CV* d'un dénombrement
selon Utermoehl	< 10%
en cylindre gradué	6-12%
par centrifugation	15-28%
par ultrafiltration	7%

La reproductibilité des résultats varie ainsi selon la méthode de concentration utilisée, et un seul dénombrement, fait avec une suspension concentrée selon les méthodes d'Utermoehl, ou selon la méthode de décantation, sera plus digne de confiance que le résultat d'une centrifugation, c'est-à-dire l'erreur probable est moins grande dans les deux premiers cas.

VI. LE DÉNOMBREMENT

Le dénombrement ou comptage même consiste en ceci: comptage des organismes (individus ou colonies) d'une ou de plusieurs espèces qui se trouvent dispersés sur le fond de la chambre à dénombrer (ou sur la membrane filtrante éclaircie). Cette opération comprend l'observation et la détermination de chaque individu, l'examen systématique de tout le sédiment (ou d'une partie définie de celui-ci), l'enregistrement des observations et, enfin, la transformation des chiffres obtenus en valeurs comparables à d'autres observations (fig. 4).

VI. 1. L'OBSERVATION DU SÉDIMENT

VI. 1.1. *La carte du sédiment*

Pour examiner systématiquement le sédiment, on « balaie » toute la préparation avec le champ de l'objectif. Le risque d'omettre des organismes se trouvant à la limite du champ visuel, est grand, ainsi que celui de compter deux fois ces mêmes organismes par un déplacement insuffisant de la préparation. Ce risque est fortement diminué par l'utilisation d'un réticulum disposé dans l'oculaire, qui délimite le champ d'observation à une bande plus ou moins large dans le centre du champ visuel (UTERMOEHL 1927, WHIPPLE, ocular micrometer, STANDARD METHODS 1955). Ce système permet de faire la somme des organismes observés, sans toutefois fournir une image de la dispersion des individus dans tout le sédiment. La division de toute la surface en aires d'observation fixes, au moyen d'un réticulum disposé sous ou sur la préparation, facilite la confection d'une copie ou « carte » presque fidèle du sédiment; la « carte de dispersion » peut être établie pour chaque organisme dans la chambre à dénombrer. L'emploi d'une telle grille est d'usage pour les hémacytomètres, et a été repris par JAVORNICKY (1958) pour ses études du sédiment dans les chambres à dénombrer. Suivant le grossissement microscopique utilisé, et éventuellement suivant la concentration du sédiment, la réticulation est choisie plus ou moins fine. Travaillant avec l'objectif 10× et oculaires 12×, une réticulation millimétrique est appropriée.

L'établissement d'une carte est nécessaire pour l'étude de la distribution du sédiment. Une personne travaillant seule fait bien d'observer le sédiment de façon monoculaire; un œil est libre pour l'enregistrement des résultats. (Disposer d'une aide à laquelle les chiffres sont dictés, est beaucoup moins fastidieux !)

Les répartitions de fréquences ainsi obtenues suffisent en général pour lec ontrôle qualitatif de la dispersion du sédiment dans la chambre. L'enregistrement des fréquences observées dans chaque unité de surface est réalisable, soit à la main par le système des coches, soit à l'aide d'appareils à compter (cf. fig. 4).

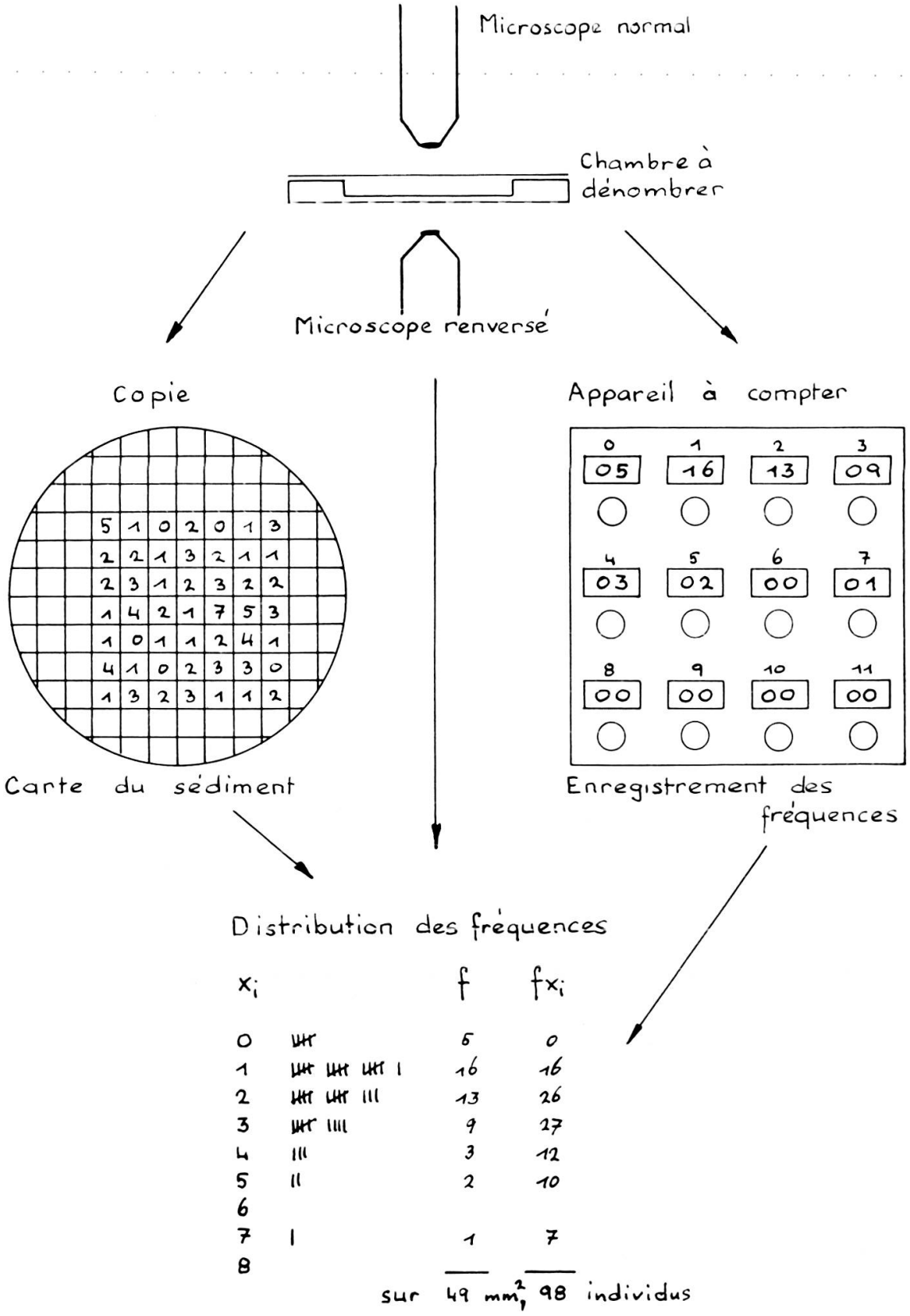


Fig. 4

Procédés de comptage

VI. 1.2. *Enregistrement mécanique*

L'enregistrement des fréquences est facilité par les appareils à compter: enregistreurs simples à un compteur pour les totaux, ou enregistreurs multiples, à plusieurs compteurs, pour les fréquences. Différentes marques se trouvent sur le marché: pour notre travail, le Vary-Tally (Veeder-Root Inc., U.S.A.) à 3×4 compteurs s'est montré un excellent auxiliaire. Les fréquences exceptionnelles, dépassant les possibilités de l'enregistreur, rencontrées par exemple dans les cas d'agglomération, seront notées à part à la main.

Du point de vue pratique, les vis du chariot de la platine sont en général disposées du côté droit du microscope; l'observateur déplace régulièrement la préparation avec la main droite et enregistre les fréquences observées dans chaque unité de surface avec la main gauche sur l'enregistreur. Si les touches du compteur correspondent toujours aux mêmes fréquences, un certain automatisme est rapidement atteint. Par le travail monoculaire, le compteur peut être surveillé sans déplacement considérable des yeux; toutefois, la détermination délicate de certains individus nécessite le travail binoculaire.

Le dénombrement d'une partie seulement de la surface, dans le cas d'une densité élevée du sédiment, implique la mesure exacte de l'aire examinée. Sans aucune réticulation ni dans l'oculaire, ni sur la chambre, le champ visuel sert d'unité de surface, après avoir été mesuré lui-même. La précision de cette méthode est incertaine, parce que:

a) les organismes se trouvant sur les bords du champ visuel sont difficiles à examiner;

b) l'erreur de mesure du diamètre est élevée au carré dans le calcul de la surface du champ, et un petit écart fausse déjà considérablement les facteurs de transformation, selon le calcul suivant.

Posons:

rayon réel du champ $= r_2$
rayon rétréci du champ $= r_1$,

alors la différence $\Delta = r_2 - r_1$.

Pour les surfaces $S_1 = r_1^2 . \pi$

et $S_2 = r_2^2 \cdot \pi = (r_1 + \Delta)^2 \cdot \pi$.

on trouve une différence $S_2 - S_1 = \pi \{ (r_1 + \Delta)^2 - r_1^2 \} = \pi (2 r_1 \Delta + \Delta^2)$.

Comme $\Delta^2 << 2 r_1 \Delta$,

on obtient $S_2 - S_1 \cong 2 \pi r \Delta \cong 6 r \Delta$.

Dans l'appréciation de la surface observée, une erreur de mesure du rayon du champ est donc multipliée par un facteur égal à six fois le rayon de ce champ.

Les aires d'un réticule oculaire ou d'un réticule disposé sous la préparation sont plus faciles à mesurer et introduisent une erreur moins importante.

VI. 1.3. *La transformation des résultats*

En dénombrant le sédiment entier, il suffit de multiplier le résultat avec le facteur de concentration, pour obtenir la densité initiale de la suspension. Ce facteur de concentration est à multiplier par un deuxième facteur, dit « de fraction », dans le cas d'un dénombrement d'une partie seulement du sédiment. Si cette partie représente une fraction relativement simple de la surface entière, le calcul est facile. Si, par contre, le dénombrement est interrompu au moment où un nombre suffisant d'organismes est dénombré (cf. § VII, VII. 2), la conversion de la fraction de surface devient laborieuse.

Des nomogrammes construits une fois pour toutes, facilitent ce travail. Les nomogrammes peuvent être construits de façon à contenir le facteur de concentration également:

en abscisse on trace la surface des édiment et en ordonnée le volume d'eau non concentrée auquel correspond la surface de sédimentation. (Cf. Annexe III,: Nomogrammes construits pour différentes chambres à dénombrer.)

Les surfaces de sédimentation des différentes chambres à dénombrer varient très fortement:

TABLEAU 20

Surfaces de sédimentation des chambres à dénombrer

Chambre à dénombrer	Surface de sédimentation
Chambre Sedgewick-Rafter	10 cm^2 = 1000 mm^2
» Kolkwitz	380 mm^2
» tubulaire Utermoehl	500 mm^2
» combinée »	500 mm^2 *2
» à plaques »	527 mm^2 *2
Filtre à membrane, monté en préparation	330 mm^2 *1

*1 La surface de sédimentation de la membrane filtrante montée en préparation (ϕ 20,5 mm) est plus petite que l'ouverture filtrante de l'appareil (ϕ 22 mm), par suite d'une contraction pendant la dessication de la membrane.

*2 La chambre à plaques a un diamètre de 25,9 mm; le cylindre de la chambre combinée est un peu plus étroit (ϕ 25 mm) pour éviter que les organismes se déposent

sur le petit bord formé dans une chambre mal ajustée, au courant de la sédimentation. Il en résulte que le sédiment est moins concentré à la périphérie de la chambre (fig. 6). On peut calculer la surface de sédimentation réelle, correspondant à la densité à l'intérieur de la chambre, en comparant une partie déterminée du dépôt (fig. 5) avec le contenu entier de la chambre, selon l'exemple suivant.

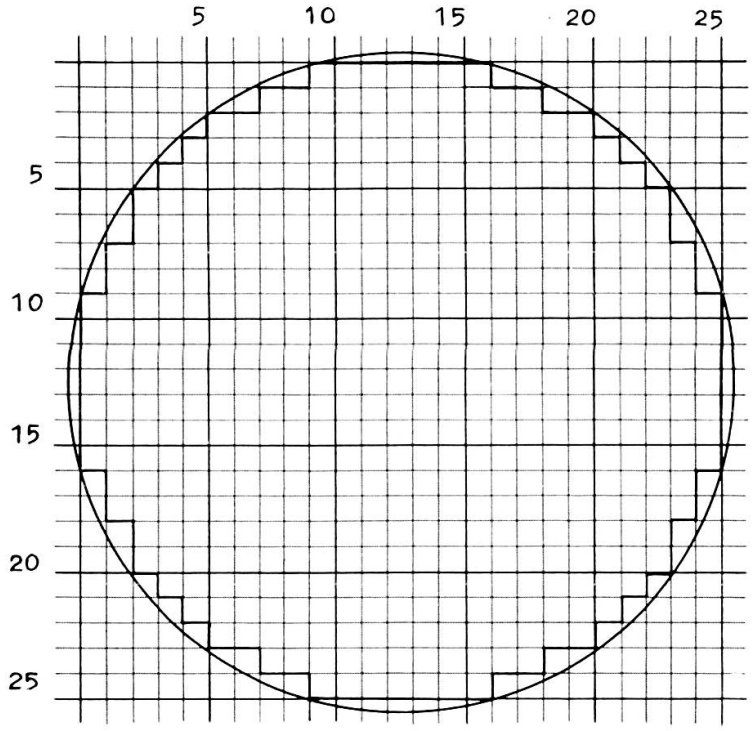


Fig. 5
Surface de sédimentation de la chambre à plaques. Quadrillage en mm².
Délimitation de 489 mm² intérieurs à la chambre.

Estimation de la surface de sédimentation correspondant au volume à sédimenter dans la chambre combinée:

Surface complète: $S_1 = 527 \text{ mm}^2$
Surface délimitée par le quadrillage: $S_2 = 489 \text{ mm}^2$.

Si a = nombre d'organismes sur 489 mm²,

et T = nombre total d'organismes dans le sédiment,

alors $\frac{T}{a} \cdot 489$ = surface réelle de sédimentation = S.

Exemple : dénombrement de *Synedra ulna* dans trois préparations de la chambre combinée, tableau 21.

La surface de sédimentation réelle de la chambre combinée peut être estimée de cette façon; nous avons adopté la moyenne de 500 mm² pour nos calculs

TABLEAU 21

Détermination de la surface de sédimentation réelle dans la chambre combinée

Chambre n°	a	T	$S = \frac{T}{a} . 489$
1	1328	1374	505,94
2	1426	1451	497,57
3	1362	1380	495,46
Moyenne du total	4116	4205	499,57

a = nombre de *Synedra* sur 489 mm².
T = nombre de *Synedra* dans tout le sédiment.

(planche II*b*). Cette valeur correspond à celle qu'indique UTERMOEHL (1958) pour la chambre à plaques. Toutefois, en remplissant la chambre à plaques avec une suspension préalablement concentrée, le fond est entièrement couvert par le sédiment, et il faut tenir compte dans les transformations d'une surface totale de 527 mm² (cf. planche II*c*).

La construction des nomogrammes à l'usage d'une méthode définie s'effectue facilement par le procédé graphique:

en abscisse la surface de sédimentation,

en ordonnée le volume d'eau avant la concentration,

la droite de conversion part de 0 et aboutit au point qui est déterminé par la surface de sédimentation totale et le volume d'eau non concentré qui lui correspond.

Exemple: au courant de la concentration par centrifugation, 30 ml d'eau sont réduits à 3 ml, dont on prélève 2,125 ml pour en remplir la chambre à plaques. La surface de sédimentation totale de 527 mm² correspond alors à un volume d'eau non concentré de 21,25 ml. Tout dénombrement partiel de la surface peut, par la droite qui relie le point 0/0 au point 527/21,25 être transformé sans calcul.

Les nomogrammes annexés en planches, pourront être directement employés par le chercheur utilisant les méthodes suivantes:

Planches II *a-d*

Nomogrammes pour	Centrifugation
	Décantation
	Ultrafiltration
combinés avec	chambre Sedgewick-Rafter
	chambres à plaques
	chambre tubulaire.

VI. 2. La répartition des organismes dans la chambre a dénombrer

Un dénombrement efficace exige une densité de l'organisme choisi située à l'intérieur de limites minimum et maximum. En étudiant une seule espèce, cette densité favorable du sédiment peut être obtenue par une concentration appropriée

Fig. 6

Partie périphérique d'une chambre combinée: amoncellement des organismes dans une zone étroite. (On remarque la zone externe pauvre en organismes, protégée par le cylindre de sédimentation moins large que la chambre.)

de l'échantillon. Par contre, le mélange de plusieurs organismes à densités très variables impose d'emblée une limitation de la surface du sédiment à examiner pour les espèces fréquentes. Le choix de cette partie dépend de la dispersion des différentes espèces à l'intérieur du dépôt. Les influences provoquant un dépôt qui ne présente pas la répartition selon les lois du hasard (phénomène fréquemment rencontré et signalé en particulier par Utermoehl 1958), sont à analyser afin de permettre une élimination des causes perturbatrices, ou de pouvoir en tenir compte dans l'appréciation des résultats.

VI. 2.1. *Tests de contrôle du sédiment*

Une sédimentation qui se ferait sans aucune influence perturbatrice externe, aboutirait à une répartition des organismes, sur le fond de la chambre à dénombrer, suivant une loi de distribution au hasard. Cette loi est caractérisée par la fonction de Poisson. La répartition selon Poisson a été très étudiée dans le cas de l'hémacytomètre et permet de contrôler le sédiment obtenu. Toute influence extérieure (par

Fig. 7
Partie centrale de la même chambre que fig. 6: densité faible des organismes dans le sédiment.

exemple des turbulences ou des courants créés pendant la sédimentation) perturbe la distribution selon Poisson et provoque une répartition imprévisible des organismes, formant soit des « nuages », soit même des agglomérations (cf. fig. 6 et 7).

Le test fréquemment utilisé pour contrôler la qualité de la distribution des organismes sur toute la surface consiste en une comparaison des fréquences observées par unité de surface, avec des fréquences théoriques calculées sur la base d'une fonction poissonienne avec la moyenne obtenue par le dénombrement. C'est le test du χ^2 *pour conformité* (cf. Annexe I). Le calcul de ce χ^2 demande passablement de travail. Un test plus rapide, se basant sur la comparaison entre la variance et la

moyenne (qui devraient être égales dans le cas d'une distribution selon Poisson) est fourni par le χ^2 *pour variance* (cf. Annexe I).

Néanmoins, il existe une différence dans l'efficacité des deux tests: le χ^2_{variance} est plus sévère que le $\chi^2_{\text{conformité}}$ (COCHRAN 1954). Une répartition jugée conforme par le χ^2 pour conformité peut, dans certains cas, être rejetée par le χ^2 pour variance. Nous avons même constaté que ceci est très souvent le cas, les distributions dans le sédiment étant fréquemment à la limite de la « fortuité ».

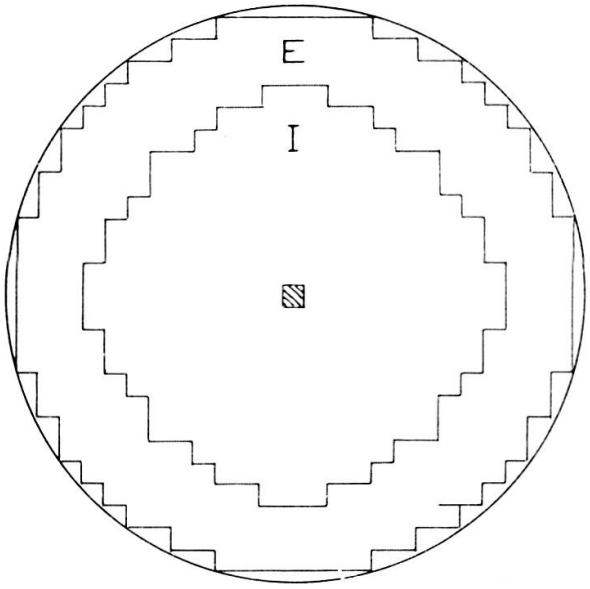


Fig. 9
Division de la chambre à plaques en deux surfaces égales:
E = partie extérieure = 244 mm²
I = partie intérieure = 244 mm².

Le χ^2 pour variance est également plus sévère que le test sur les fréquences cumulatives selon Kolmogorov-Smirnov, utilisé par JAVORNICKY (1958). Cet auteur conclut dans vingt-deux cas sur vingt-six à une bonne répartition du sédiment. Le test du χ^2_{variance} mène, dans l'exemple que cite l'auteur, au rejet de cette hypothèse (JAVORNICKY 1958, p. 303, carte du sédiment d'*Euglena* dans une chambre Kolkwitz):

5701 *Euglena* sur 1376 carrés:

Kolmogorov-Smirnov-test: $\lambda = 4{,}143$; la répartition selon Poisson est acceptée;

χ^2_{variance}-test: $\chi^2 = 1508$, avec une valeur critique de $\chi^2_{0{,}05} = 1387$; la répartition selon Poisson est rejetée.

Si la sédimentation dans une chambre à dénombrer se fait réellement au hasard, sans aucune influence perturbatrice, tous les tests, sévères ou non, mènent à l'acceptation de la répartition. Ce n'est que dans le cas où cette répartition subit déjà

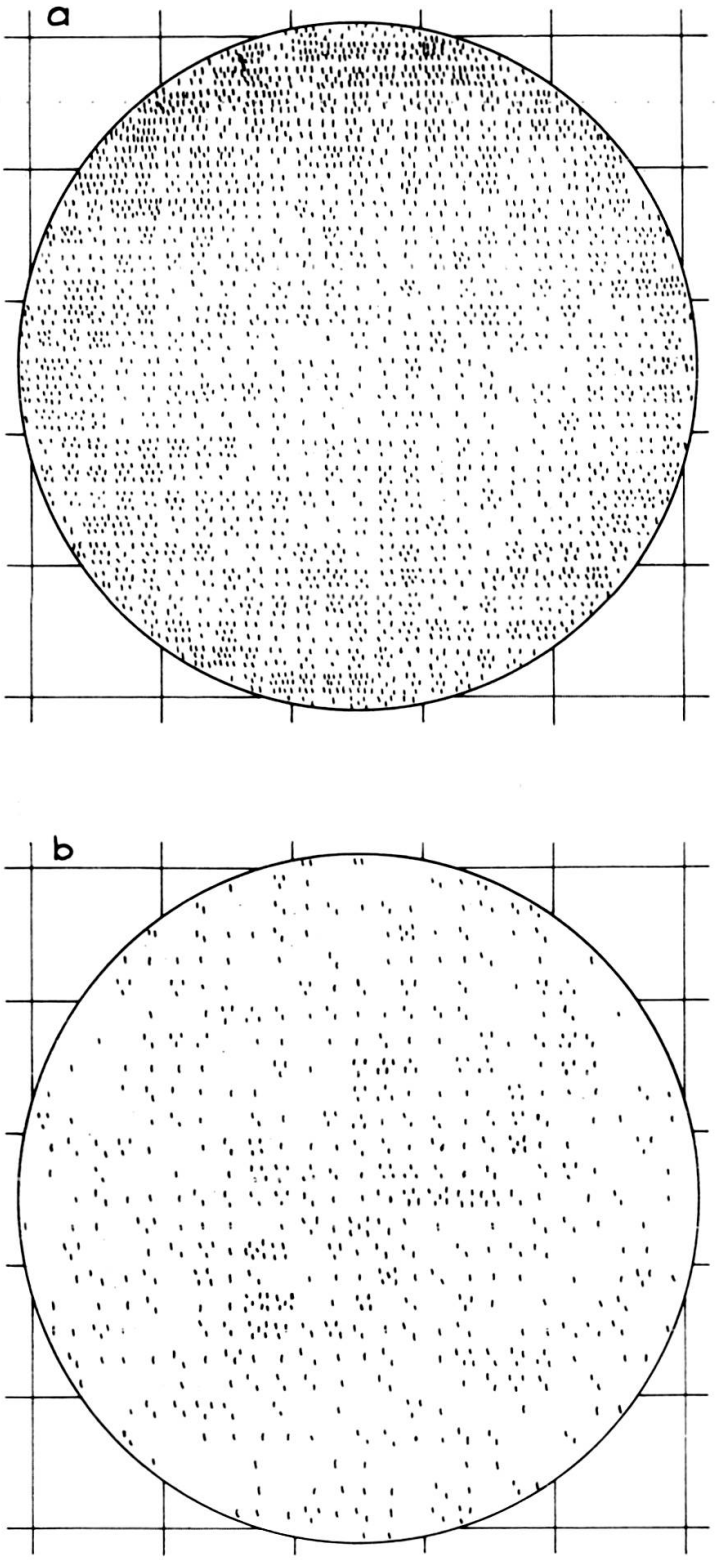


Fig. 8

Répartition des *Synedra ulna* dans le sédiment de la chambre à plaques,
8a: préparée sous forme de chambre combinée. Densité plus élevée à la périphérie.
8b: remplie à la pipette. Densité plus élevée au centre.

quelques influences externes, que notre jugement dépendra de la sévérité du test, à savoir si une répartition du sédiment « ressemble » encore suffisamment à une répartition selon Poisson, pour le travail envisagé.

VI. 2.2. *Remplissage des chambres combinées et tubulaires selon Utermoehl*

La chambre à plaques peut être remplie soit combinée avec le cylindre de sédimentation à volume fixe, soit à la pipette avec une suspension concentrée auparavant. De ces deux techniques de remplissage résultent des répartitions différentes du dépôt. Dans la chambre combinée, les organismes ont tendance à se poser en plus grand nombre vers la périphérie de la chambre (cf. fig. 6 et 7, et fig. 8*a* et *b*) tandis que le remplissage à la pipette entraîne une densité plus élevée des organismes vers le centre de la chambre. L'expérience suivante nous fournit un exemple:

Série I: Quatre préparations de la chambre combinée, dont les cartes de sédimentation sont copiées en entier pour *Synedra ulna*.

Série II: Quatre préparations de la chambre à plaques, remplie chaque fois à la pipette, dont les cartes sont copiées en entier.

Divisons la surface totale en deux parties égales (fig. 9):

I = un disque central de 244 mm^2, et
E = un anneau périphérique de 244 mm^2.

TABLEAU 22

Nombre de Synedra ulna *dans la partie extérieure* (E) *et la partie intérieure* (I) *du sédiment de la chambre combinée et de la chambre à plaques*

Sédiment de la chambre combinée			Sédiment de la chambre à plaques		
I	*E*	Total	*I*	*E*	Total
937	1192	2129	527	179	706
875	1117	1992	461	374	835
889	1283	2172	640	241	881
924	1553	2477	417	408	825
3625	5145	8770	2045	1202	3247

Les résultats (tableau 22) indiquent que la densité des organismes est très différente dans les deux types de préparations: l'anneau extérieur dans la chambre

combinée porte un plus grand nombre d'organismes que le disque intérieur. La chambre à plaques, remplie à la pipette, présente une distribution inverse des organismes. En remplissant la chambre à plaques avec une pipette, il est très difficile d'éviter les courants circulaires dus à la forme ronde de la cuvette. Au centre de la chambre ces courants sont à l'origine de l'amoncellement des organismes. Les causes du déplacement des organismes vers la périphérie de la chambre combinée sont discutées au paragraphe suivant.

VI. 2.3. *Température de remplissage*

Les parois du cylindre de la chambre combinée sont exposées aux variations de la température ambiante. Il est donc possible que des échanges caloriques provoquent des courants à l'intérieur de la chambre, pendant la sédimentation qui dure 18 à 24 heures.

Si tel est le cas, un échantillon froid versé dans la chambre combinée, présente un déplacement du dépôt plus important qu'un échantillon ramené auparavant à la température ambiante. Voici l'expérience qui peut répondre à cette question:

Trois échantillons de la même pêche sont divisés en deux lots: le premier est conservé au froid (4° C) jusqu'au moment de la préparation de la chambre combinée, l'autre est chauffé un peu au-dessus de la température du laboratoire (1 degré de différence). Les deux chambres à dénombrer contenant le même échantillon sont remplies simultanément. La sédimentation pendant 24 heures est faite à l'abri de la lumière. Dans le sédiment, quatre espèces sont dénombrées:

Synedra ulna (individus), *Eudorina elegans* (cénobes), *Codonella lacustris* (individus), *Ceratium hirundinella* (individus).

Les résultats sont résumés dans le tableau 23.

L'accumulation des organismes à la périphérie suivant le courant créé par le réchauffement du liquide le long des parois est évidente. La carte d'un tel sédiment, représentée dans les figures 11*b* et 12*b*, montre en outre que l'accumulation est la plus dense du côté du réchauffement le plus fort. Un remplissage à température trop élevée provoque les courants inverses: l'accumulation se fait au centre de la chambre (fig. 11*a* et 12*a*). En général, un laboratoire n'est pas chauffé uniformément (fenêtres, corps de chauffage, parois froides, etc.) et le sédiment sera asymétriquement déplacé suivant l'intensité des courants ascendants et descendants, provoqués par le réchauffement ou le refroidissement des parois du cylindre de sédimentation (fig. 10). En réalité, ces courants sont très faibles; les organismes se déposent malgré ces courants. Leur influence s'exerce sur la forme de la répartition des organismes dans le sédiment, répartition qui ne suit plus la loi de Poisson.

TABLEAU 23

Effet de la température de l'échantillon au moment du remplissage de la chambre combinée. Dénombrement de quatre espèces dans la moitié extérieure et intérieure du sédiment

Echantillon	Température au remplissage	Partie du sédiment	*Synedra*	*Eudorina*	*Codonella*	*Ceratium*
1	6,5° C	Ext.	918	45	59	15
		Int.	457	5	8	5
		Total	1375	50	67	20
	18,5° C	Ext.	651	35	16	6
		Int.	723	28	18	7
		Total	1374	63	34	13
2	4,5° C	Ext.	1073	61	46	14
		Int.	389	14	8	9
		Total	1462	75	54	23
	19,0° C	Ext.	512	14	13	5
		Int.	943	60	43	16
		Total	1455	74	56	21
3	5,5° C	Ext.	950	35	53	10
		Int.	475	15	11	4
		Total	1425	50	64	14
	18,5° C	Ext.	615	12	21	5
		Int.	759	52	47	10
		Total	1374	64	68	15

VI. 2.4. *Spécificité du sédiment*

Nous venons de voir que le sédiment dans la chambre combinée peut présenter une répartition non fortuite à la suite de courants thermiques à l'intérieur du cylindre de sédimentation. Le dessin que forme le sédiment dans ces conditions n'est pas nécessairement le même pour toutes les espèces présentes dans le plancton. En raison de leur poids et leurs formes variables, régissant la vitesse de sédimentation, les organismes subissent différemment l'effet de déplacement.

La comparaison de la dispersion de différentes espèces à l'intérieur d'une chambre à dénombrer peut se faire en comparant d'une part les distributions de fréquences (χ^2_{variance}) et d'autre part en étudiant les différences de fréquences à l'intérieur de parties délimitées du sédiment (tableaux de contingences, cf. Annexe I), dans notre cas, en comparant le disque central et le cercle périphérique (« Int. » et « Ext. »).

La comparaison des χ^2_{variance} pour chaque espèce est sujette à caution : ce critère dépend de la fréquence des organismes (COCHRAN 1954). En comparant deux distributions à moyenne très dissemblable, ce χ^2 n'est plus applicable.

L'application du χ^2 sur des tableaux de contingences est appropriée, même dans le cas de densités très dissemblables. En utilisant ce procédé dans l'expérience du § VI. 2.3 sur les chambres à répartition très irrégulières, c'est-à-dire sur les chambres qui ont été remplies avec un échantillon froid, nous obtenons le résultat suivant (tableau 24):

TABLEAU 24

χ^2 (contingences) pour la comparaison des répartitions de différentes espèces dans le même sédiment
** = χ^2 accusant une différence significative*

Echantillon	Degré de liberté	Comparaison		
		Synedra-Codonella	*Synedra-Eudorina*	*Synedra-Ceratium*
1. 6,5° C	1	13,06	11,89	0,60
2. 4,5° C	1	3,75	2,33	1,81
3. 5,5° C	1	7,26	0,24	0,14
	3	24,07 *	14,46 *	2,55
Total des échantillons	1	22,58 *	10,60 *	0,12
Homogénéité (= différence) .	2	1,49	3,86	2,43

Le tableau 24 révèle une concordance des répartitions de *Synedra* et de *Ceratium*; *Codonella*, par contre, est différemment répartie, étant plus concentrée encore à la périphérie que *Synedra*; le résultat de *Eudorina* est moins précis: une fois sa dispersion diffère de celle de *Synedra*, et dans les deux autres cas elle semble répartie de la même manière. Ceci s'exprime dans le χ^2 pour homogénéité qui indique si les trois préparations sont homogènes ou non. Dans le cas de *Eudorina*, ce χ^2 n'est pas encore significatif, mais il est plus élevé que chez les deux autres groupes.

Il ressort clairement de cette expérience que les différentes espèces présentent la même tendance à s'accumuler à la périphérie de la chambre, mais elles répondent avec une intensité différente aux influences des courants thermiques. Il en résulte des dispersions dissemblables pour différents organismes.

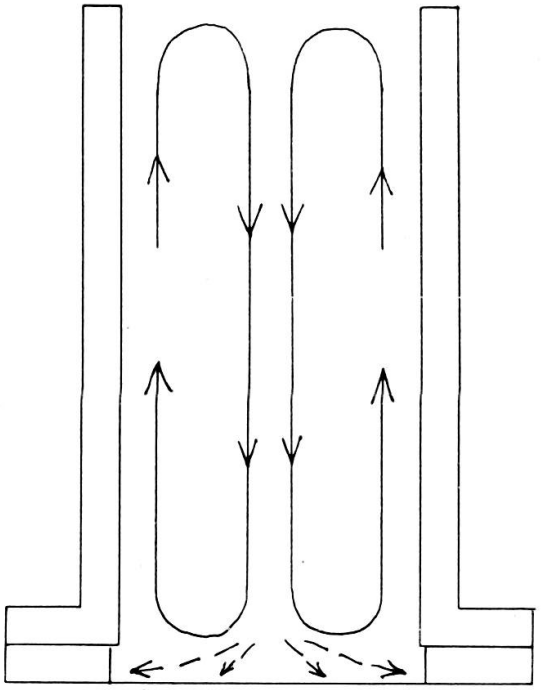


Fig. 10
Courants thermiques dans la chambre à sédimentation: réchauffement du liquide le long des parois, et déplacement du sédiment vers la périphérie.

VI. 2.5. *Le sédiment dans la chambre Sedgewick-Rafter*

Dans une chambre de forme circulaire les courants sont très difficilement évités. Par contre, la forme rectangulaire de la chambre Sedgewick-Rafter arrête rapidement les courants. La répartition des organismes dans la chambre Sedgewick-Rafter suit la loi de Poisson, ce qui a été montré par plusieurs auteurs déjà, en particulier par GILBERT (1942) qui a trouvé le procédé de remplissage qui assure une répartition correcte des organismes. Ces résultats ont été confirmés par nos propres expériences: sur dix-sept chambres contrôlées, une seule a présenté un χ^2_{variance} supérieur au $\chi^2_{0,05}$, les autres étant en général beaucoup plus petits que cette valeur critique.

VI. 3. LE DÉNOMBREMENT PARTIEL

Le dénombrement complet d'espèces à densité élevée représente un travail énorme, disproportionné par rapport à la précision qu'il peut fournir. L'extrapolation

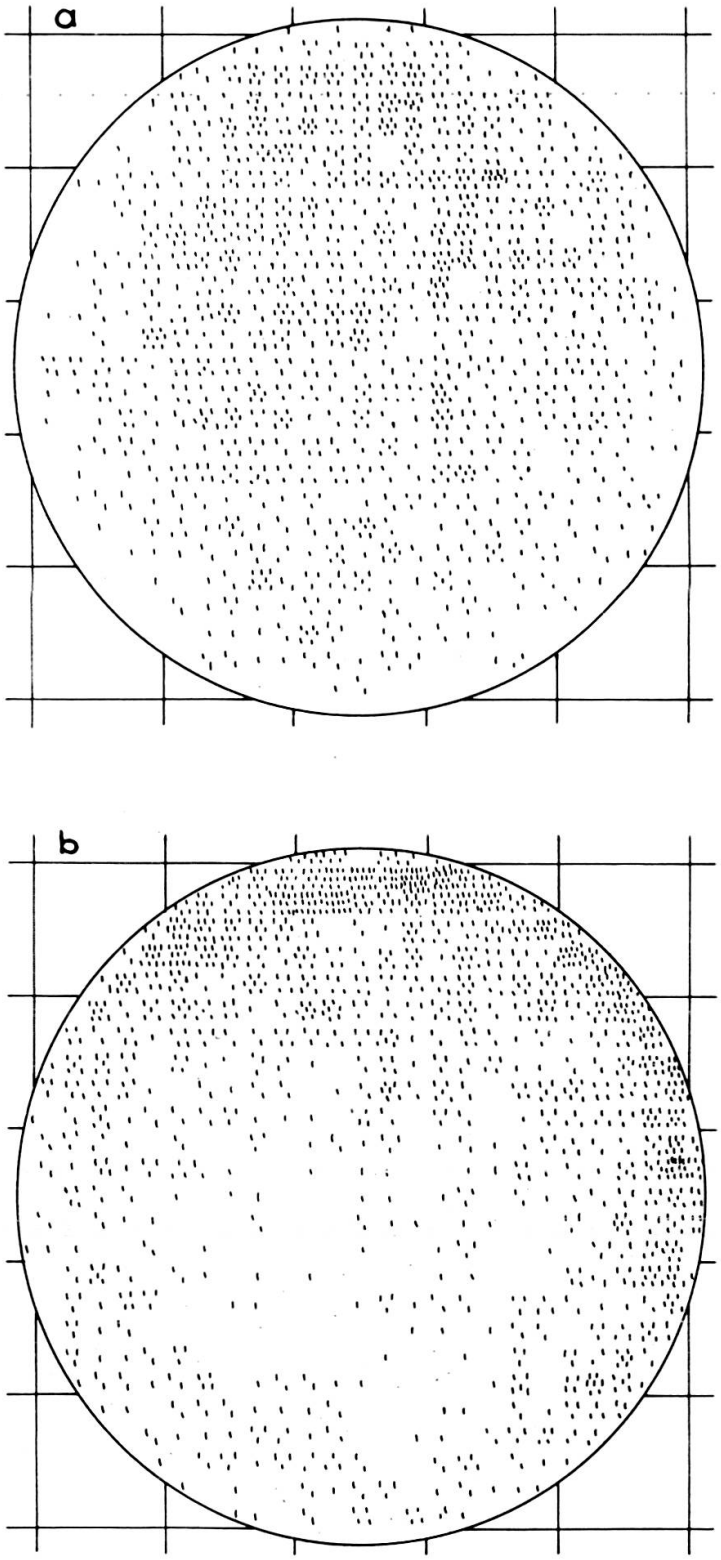
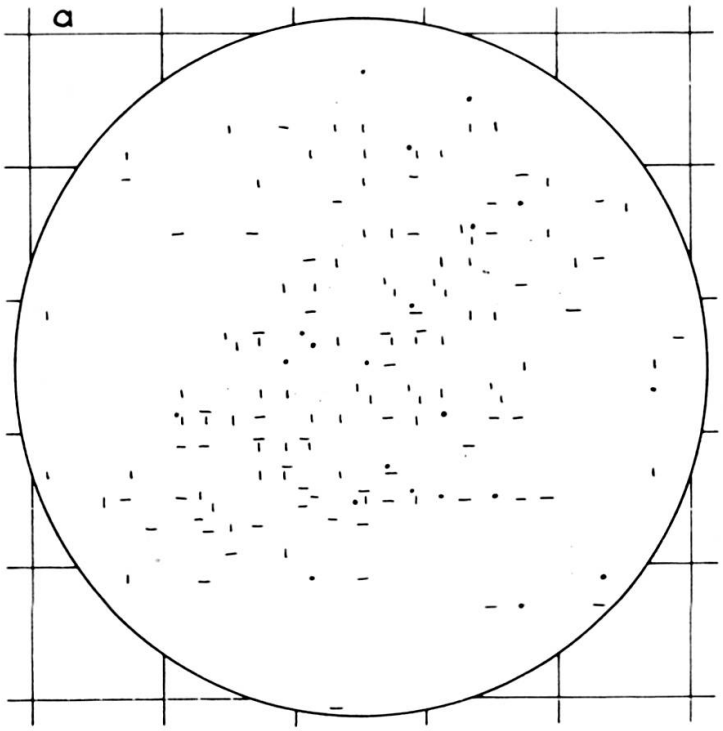


Fig. 11

Effet de la température de l'échantillon au moment du remplissage de la chambre: répartition non-fortuite des *Synedra ulna*

11 *a*: température au remplissage 19,0° C
11 *b*: température au remplissage 4,5° C.



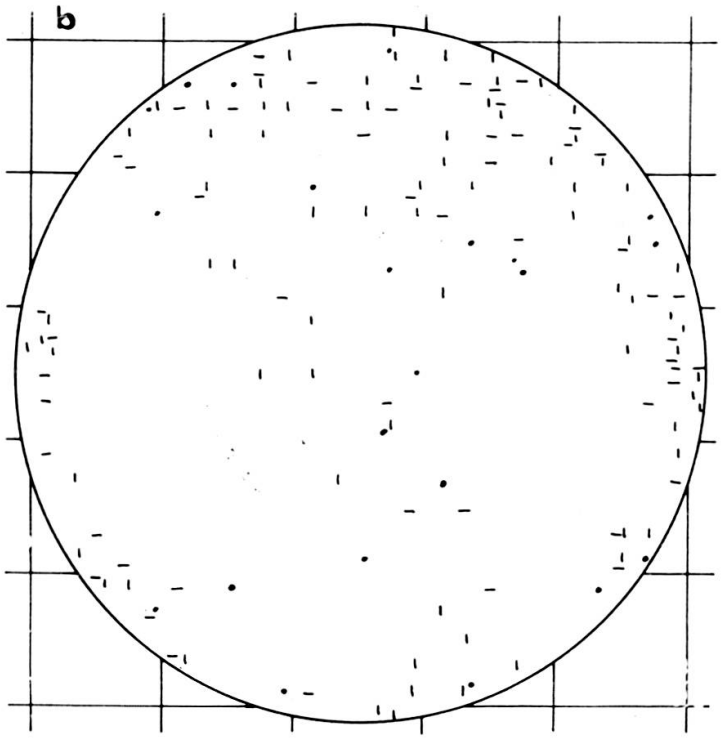


Fig. 12

Répartition non-fortuite spécifique:

12 *a*: température au remplissage 19,0 C

12 *b*: température au remplissage 4,5° C.

' = *Eudorina* — = *Codonella* . = *Ceratium*

à partir du nombre fourni par une partie délimitée de la chambre permet de réduire le travail à l'optimum utile. L'emploi d'une suspension plus diluée permettrait de se passer d'un dénombrement partiel; toutefois, la dilution porte préjudice au dénombrement des organismes moins fréquents. Dans le chapitre précédent (§ VI. 2.3) nous avons vu qu'une répartition normale selon les lois du hasard ne se réalise que très rarement dans les sédiments des chambres rondes (Kolkwitz et Utermoehl). La présence d'une telle répartition n'est jamais connue à l'avance et ne peut être obtenue à volonté. Il est donc nécessaire de choisir un système d'échantillonnage d'aires à dénombrer qui fournira des moyennes $\bar{x}$ correspondant à la moyenne réelle (moyenne fournie par le dénombrement complet de la chambre), dans n'importe quel sédiment à répartition fortuite, ou non.

Pour le dénombrement partiel, plusieurs modes d'échantillonnage à l'intérieur de la chambre sont proposés:

1° Choix d'une région jugée caractéristique. Cette méthode est soumise à des appréciations subjectives incertaines, et n'est plus valable dans un sédiment à mauvaise dispersion;

2° Choix de plusieurs régions suivant un modèle systématique régulier.

Cette méthode est mécaniquement la plus facile à réaliser.

L'échantillonnage systématique peut fournir des résultats intéressants, si les aires examinées sont choisies uniformément sur toute la surface de sédimentation, à condition que le sédiment ait une répartition fortuite. GREIG-SMITH (1957) fait justement remarquer que « dans le cas de l'échantillonnage systématique, on peut obtenir une estimation de la moyenne qui, dans certaines circonstances, dévie moins de la moyenne réelle que l'estimation donnée par l'échantillonnage au hasard; la méthode de l'échantillonnage systématique ne fournit pourtant aucune indication de sa précision et aucune possibilité d'attribuer une significativité à l'écart entre les moyennes de différentes préparations ». Il est d'usage, souvent, de dénombrer une bande horizontale ou verticale sur le diamètre de la chambre, de largeur nécessaire pour fournir un nombre suffisant d'individus. UTERMOEHL (1958) propose de choisir quatre bandes dans le sens des diagonales. Cette méthode peut parfois fournir une moyenne suffisamment correcte. Pour des critères de comparaison, cette moyenne est toutefois trop incertaine: il est impossible de lui attribuer une variance statistiquement valable, et elle souffre d'uniformité de représentation (la moitié des diagonales se trouve dans une zone centrale représentant seulement un quart de la surface totale !).

3° Choix de plusieurs aires de dénombrement suivant un système d'échantillonnage au hasard.

A l'aide d'une table de nombres disposés au hasard, on détermine d'avance certains points dispersés sur toute la surface, points autour desquels sera délimitée

une petite région à examiner (soit un champ visuel, soit un carré d'un réseau). Cette méthode permet d'évaluer, outre la moyenne, la variance qui nous donne la précision de cette moyenne. Une comparaison entre différentes moyennes devient ainsi statistiquement possible, conduisant à un jugement valable de la significativité des écarts.

VI. 3.1. *Comparaison de différents systèmes de dénombrement partiel*

Afin de comparer les systèmes de dénombrement partiel proposés au paragraphe précédent, et de déterminer leur précision ainsi que leur efficacité, nous avons procédé à l'analyse de cinq modes différents d'échantillonnage à l'intérieur de divers sédiments de chambres combinées Utermoehl.

Modes d'échantillonnage :

La surface totale de la chambre à plaques selon Utermoehl est divisée par un quadrillage en 527 mm^2, dont 489 sont des carrés entiers (cf. fig. 5). L'unité de surface est de 1 mm^2. Le quadrillage comprend 25 lignes et 25 colonnes numérotées de 1 à 25 respectivement. L'examen de 100 carrés a été décidé sur la base des principes discutés au § VII. 2. Ces 100 carrés sont disposés dans la carte de diverses manières:

a) sur une bande horizontale, comprenant 4 lignes de 25 mm^2 (fig. 13*a*);

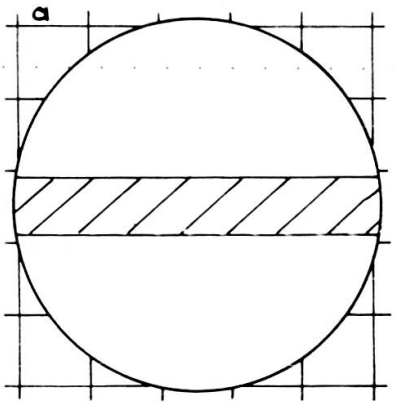
b) sur une bande horizontale de 2×25 mm^2 et une bande verticale de 2×25 mm^2 (fig. 13*b*);

c) quatre fois 25 carrés situés à proximité des quatre diagonales de la surface;

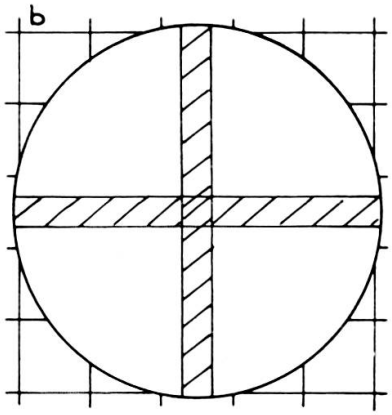
d) selon un système de 5×20 carrés choisis au hasard de la manière suivante: dans les tables de FISHER & YATES (1953) des « Random Numbers », on examine les quatre premiers chiffres de chaque valeur des colonnes; les deux premiers chiffres donnent l'indice de la ligne du réseau, les deux chiffres suivants indiquent la colonne de ce réseau. Les carrés dont les indices tombent à l'intérieur du réseau, calqué sur un papier transparent, sont encadrés et numérotés au fur et à mesure. Une feuille transparente peut contenir 20 carrés. Ces indices sont encore utiles, indépendamment de l'établissement d'une carte, pour le dénombrement direct du sédiment, opéré par un mouvement des vis millimétriques de la platine. Disposant de la carte du sédiment, nous avons pu superposer la feuille transparente à la carte et lire ainsi les nombres présents dans les carrés fixés à l'avance. L'enregistrement chronologique des fréquences permet par la suite une analyse séquentielle. « Système *A* » (fig. 13*d*);

e) selon un système analogue à celui mentionné sous *d)* que nous appellerons « Système *B* » (cf. Annexe II);

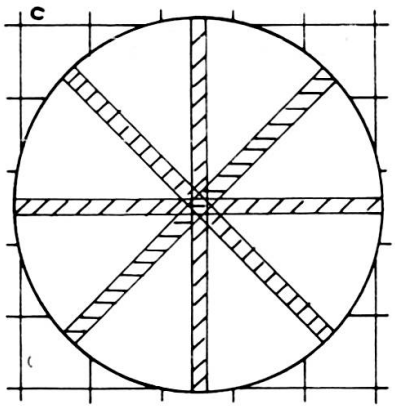
f) pour le contrôle des moyennes de l'ensemble de base, le sédiment entier est compté.



13 *a*: Bande horizontale.



13 *b*: Bande horizontale + bande verticale.



13 *c*: Quatre diagonales.

Fig. 13 *a-c*

Dénombrement partiel: choix des aires à dénombrer selon des procédés systématiques. Délimitation de 100 mm².

Sédiments dans la chambre combinée :

A partir d'une suspension planctonique de base, deux séries de trois chambres combinées identiques sont soumises à l'analyse:

1° trois sédiments à distribution aussi fortuite que possible, obtenus par une préparation très soigneuse de la chambre. Le sédiment dans ces chambres est presque fortuitement distribué (χ^2_{variance}, tableau 25.1);

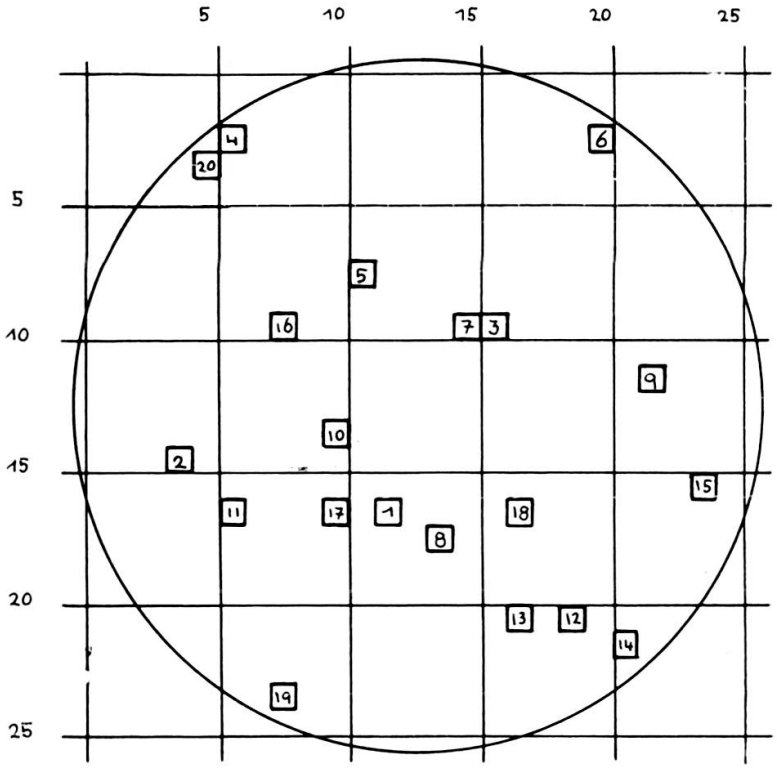


Fig. 13 *d*

Dénombrement partiel: choix des aires à dénombrer selon un système au hasard. Délimitation des 20 premiers mm².

2° Trois sédiments avec une très mauvaise distribution du plancton, obtenus par un remplissage de la chambre combinée avec un échantillon froid de 4° C (cf. § VI. 2.2). La mauvaise distribution des organismes s'exprime par les χ^2_{variance} qui dépassent largement la valeur critique (tableau 25.2).

Les sédiments des chambres à dénombrer ne se conservent que quelques heures au maximum. Aux fins de dénombrements répétés dans la même préparation, nous copions la carte du sédiment de *Synedra ulna* de chaque chambre. Les différents modes d'échantillonnage sont ensuite superposés à ces cartes. Ce procédé élimine au surplus les erreurs personnelles de détermination qui se présenteraient dans la répétition des dénombrements sur la préparation même.

Dénombrements :

Dans chaque sédiment ou carte, les cinq modes d'échantillonnage fournissent une moyenne $\bar{x}$ de *Synedra* par carré du réseau. Les tableaux 25.1 et 25.2 présentent les valeurs de $\bar{x}$ pour les chambres des deux séries.

TABLEAU 25.1

Nombre de Synedra/*mm*² *dans le sédiment à distribution fortuite de trois chambres combinées, après différents dénombrements partiels (100 carrés du réseau)*

Mode de dénombrement partiel	Préparation *I*	*II*	*III*
a) horizontal	2,40	2,81	2,47
b) horizontal + vertical	2,77	3,25	2,76
c) en diagonales	2,64	3,15	2,89
d) au hasard (système *A*)	2,50	2,74	2,50
e) au hasard (système *B*)	2,52	2,77	2,76
f) total de la chambre (= moyenne réelle)	2,75	2,90	2,76
$\chi^2_{variance}$ pour toute la chambre ($\chi^2_{0,05}$ = 551)	624	692	697

TABLEAU 25.2

Nombre de Synedra/mm², *dans le sédiment à distribution non-fortuite de trois chambres combinées, après différents dénombrements partiels (100 carrés du réseau)*

Mode de dénombrement partiel	Préparation *I*	*II*	*III*
a) horizontal	1,83	1,49	1,69
b) horizontal + vertical	1,91	1,90	2,21
c) diagonales	2,08	1,82	2,05
d) au hasard (système *A*)	2,32	2,21	2,46
e) au hasard (système *B*)	2,72	2,52	2,48
f) total de la chambre (= moyenne réelle)	2,75	2,91	2,85
$\chi^2_{variance}$, pour toute la chambre ($\chi^2_{0,05}$ = 551)	1736	1592	970

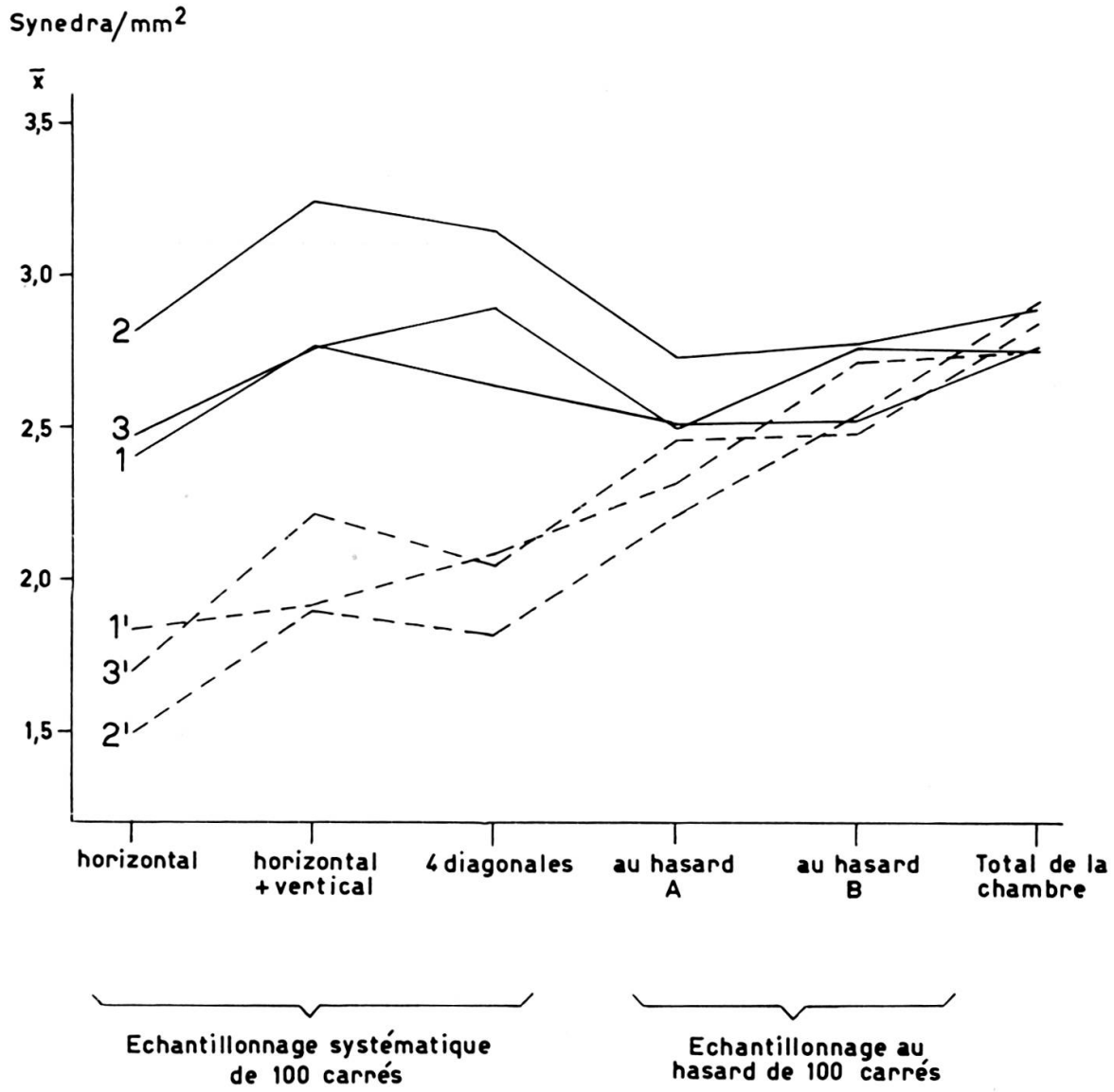


Fig. 14

Moyennes fournies par différentes méthodes de dénombrement partiel dans la chambre combinée. Nombre de *Synedra ulna*/mm².

——— Sédiment à distribution presque fortuite

— — — Sédiment à distribution non-fortuite.

Résultats :

Dans la première série de chambres à distribution presque fortuite, les écarts entre les moyennes fournies par les différents modes de dénombrement partiel ne sont pas très importants. La moyenne réelle établie par le dénombrement de la chambre entière, est serrée de près (fig. 14). Pourtant, l'analyse de variance (tableau 25.3) accuse des différences légèrement significatives entre les modes d'échantillonnage:

$$F\frac{(\text{modes})}{(\text{carrés})} = 2{,}604 \qquad \text{avec } F_{0{,}05} = 2{,}372$$

TABLEAU 25.3

Analyse de variance des différents modes d'échantillonnage à l'intérieur de trois préparations à répartition quasi-fortuite

Source de variance	*DL*	*SC*	*CM* = variance
Modes d'échantillonnage	4	35,677	8,919
Préparations de la chambre	2	37,801	18,900
Interaction Méthodes-Préparations	8	8,359	1,045
Carrés du réseau	1485	5086,730	3,425
Total	1499	5168,567	

TABLEAU 25.4

Analyses de variance entre différents modes d'échantillonnage à l'intérieur de trois préparations à répartition non-fortuite

Source de variance	*DL*	*SC*	*CM* = variance
Modes d'échantillonnage	4	146,863	36,716
Préparations de la chambre	2	11,172	5,586
Interaction Méthodes-Préparations	8	11,181	1,398
Carrés du réseau	1485	8238,290	5,548
Total	1499	8407,506	

Nous avions vu que la distribution du sédiment était presque fortuite dans cette série, en comparaison avec la deuxième série à très mauvaise distribution. Toutefois, la répartition de Poisson n'étant que médiocrement ajustée, les différents modes de dénombrement partiel n'offrent des résultats qu'approximativement identiques. D'ailleurs la beaucoup plus grande variabilité entre préparations absorbe ces petites différences.

Par contre, dans les sédiments à mauvaise distribution des organismes, l'échantillonnage systématique du dénombrement partiel fournit des moyennes beaucoup trop faibles. L'échantillonnage au hasard donne des moyennes qui se rapprochent mieux des vraies moyennes (fig. 14). L'analyse de variance (tabl. 25.4) montre que les divers modes d'échantillonnage fournissent des moyennes significativement différentes. Ces différences se manifestent malgré la plus grande variance entre les carrés du réseau :

$$F\frac{(\text{modes})}{(\text{carrés})} = 6{,}61 \qquad \text{avec } F_{0.05} = 2{,}372, \quad \text{et } F_{0.001} = 4{,}616.$$

Conclusions :

Les résultats fournis par les différentes méthodes de dénombrement partiel sont significativement différents. Les tableaux 25.1 et 25.2 des moyennes indiquent cependant que les modes d'échantillonnage au hasard donnent des valeurs qui se rapprochent le plus de la moyenne réelle dans la chambre. L'inconvénient de l'échantillonnage systématique (horizontal ou horizontal et vertical) est évident sans mesure ni calcul dans le cas d'une distribution non fortuite: il suffit que la bande passe à côté du nuage pour annuler la valeur du dénombrement. Il s'agit ici d'un cas extrême. Toutefois, même lorsque l'on réussit à obtenir une distribution quasi fortuite, l'écart entre la moyenne réelle de la chambre et une moyenne d'échantillonnage systématique reste légèrement significatif. Même l'artifice complémentaire d'une lecture en diagonales, proposée par UTERMOEHL (1958), ne corrige pas l'incertitude des valeurs systématiques.

Dans la pratique, l'expérimentateur trouvera des valeurs situées entre les extrêmes représentés par les tableaux 25.1 et 25.2. Dans le paragraphe VI. 2.3 nous avons vu qu'en conditions de laboratoire les sédiments présentent pratiquement toujours de légères déformations. La seule méthode de dénombrement partiel menant à un résultat valable doit alors se baser sur un mode d'échantillonnage au hasard des aires à examiner.

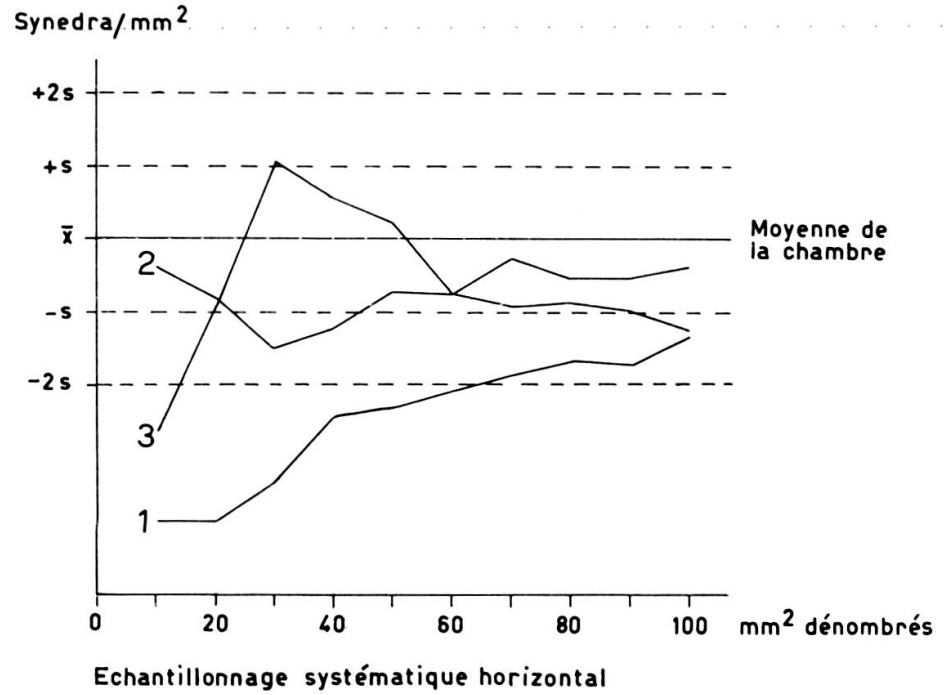
VI. 3.2. *Rapidité avec laquelle la moyenne du dénombrement partiel s'approche de la vraie moyenne*

Cette analyse illustre d'une autre manière les résultats mentionnés au paragraphe précédent. Elle permet en plus de fixer le moment du dénombrement où les frais de l'opération peuvent être arrêtés, pour éviter un gaspillage de travail.

Par une analyse séquentielle du dénombrement partiel on obtient une image du rapprochement de la moyenne partielle vers la moyenne réelle. La rapidité de ce rapprochement peut être une mesure de la qualité de l'échantillonnage. Les figures 15*a* et 15*b* montrent deux exemples: l'échantillonnage systématique sur une bande horizontale et l'échantillonnage par un système choisi au hasard, effectués 1° dans un sédiment approximativement fortuit et 2° dans un sédiment à répartition non fortuite. Les courbes sont obtenues par le calcul de la moyenne après 10, 20, 30, ..., 90 et 100 carrés dénombrés successivement. Pour faciliter la lecture, les trois moyennes réelles sont établies à une ordonnée commune.

Résultats :

1° (Fig. 15*a*.) Dans le cas de la répartition presque fortuite, la moyenne trouvée se situe déjà après 40 carrés (ca. 100 individus dénombrés) à l'intérieur des limites $\bar{x} \pm 2.s$ ($s = 10\%$ selon Poisson). Toutefois, la répartition n'étant



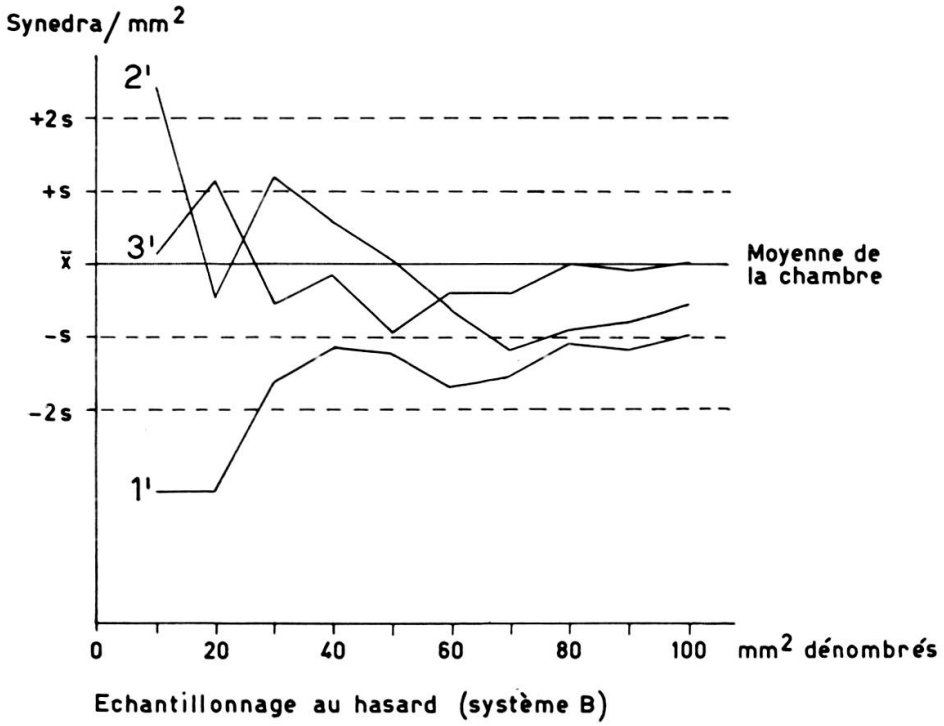
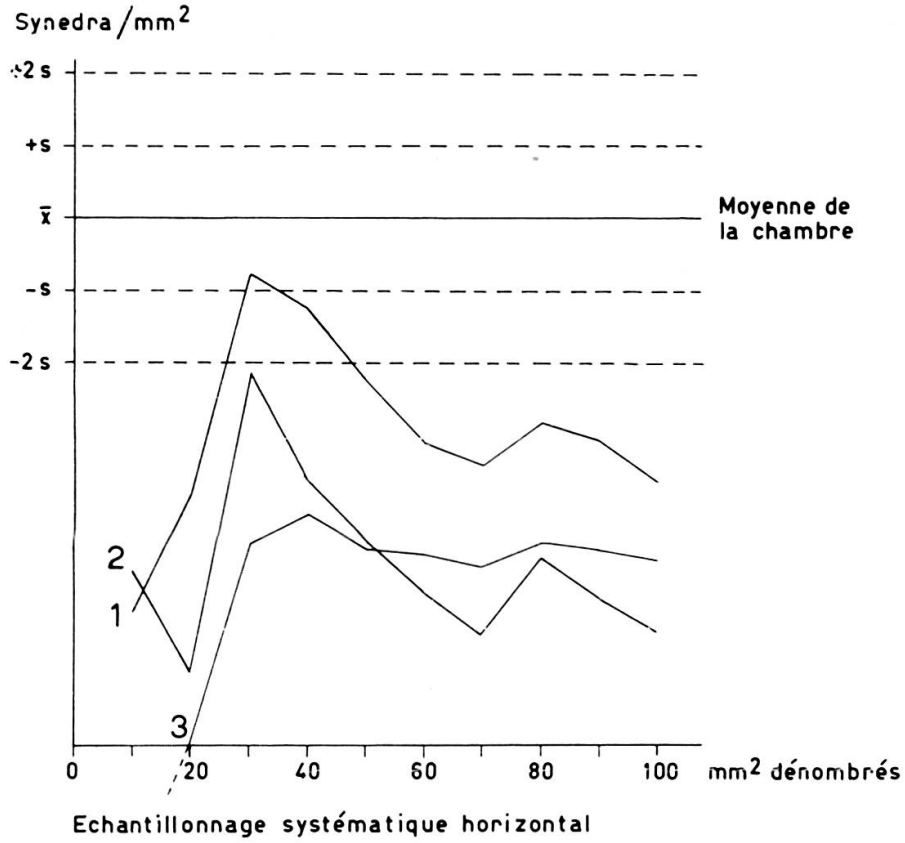


Fig. 15 *a*

Evolution de la moyenne après 10, 20, . . , 100 mm² dénombrés, dans un sédiment à distribution presque fortuite (trois préparations à partir de la même suspension).



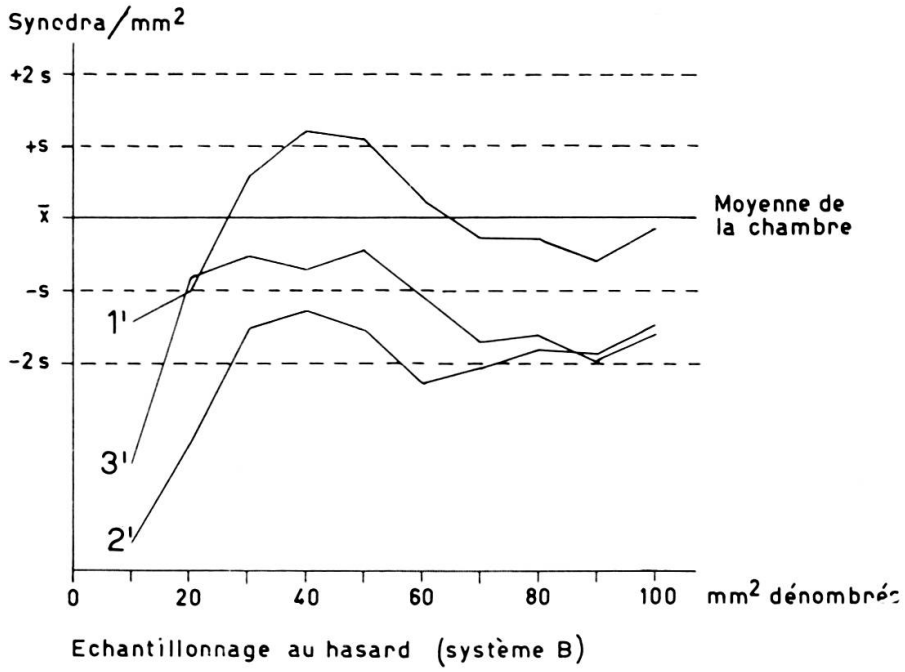


Fig. 15 *b*

Evolution de la moyenne dans un sédiment à distribution non-fortuite.

qu'approximativement fortuite (les χ^2_{variance} dépassent toujours le $\chi^2_{0,05}$), l'échantillonnage au hasard mène encore plus rapidement au résultat correct. Avec ce dernier système, toutes les trois courbes se trouvent à l'intérieur de $\bar{x} \pm 25$ après 30 carrés dénombrés.

2° (Fig. 15*b*.) Dans un sédiment d'une répartition mauvaise, le dénombrement systématique ne donne aucune valeur moyenne raisonnable, même après dénombrement de 100 carrés (= 250 individus, sur un cinquième de la surface totale). Par contre, par l'échantillonnage au hasard, on obtient une moyenne s'approchant de la vraie valeur $\bar{x}$ après peu de carrés dénombrés. Comme dans le sédiment réparti normalement, après 30 carrés (= 75 individus), les trois moyennes se trouvent à l'intérieur des limites $\bar{x} \pm 2s$. Il est cependant évident que la moyenne calculée dans ce cas est moins précise que dans une répartition normale.

Si la technique le permet, c'est-à-dire si l'on dispose par exemple d'un chariot à déplacements contrôlables, il sera toujours préférable d'utiliser les méthodes d'échantillonnage au hasard. A l'usage de l'intéressé, deux systèmes sont indiqués dans l'annexe (Annexe II) de ce travail.

Ces observations sont généralisables: le problème du prélèvement d'échantillons dans un ensemble à distribution inconnue ou supposée non fortuite se présente fréquemment dans des études écologiques ou autres.

L'échantillonnage selon un schéma de points répartis au hasard sur toute la surface (dans le cas d'un ensemble deux-dimensionnel) ou dans tout le volume (pour un ensemble à trois dimensions) fournit une moyenne plus digne de confiance que toute moyenne obtenue par un schéma régulier quelconque.

VI. 3.3. *La variance à l'intérieur des chambres, entre carrés du réseau*

Un mode d'échantillonnage systématique à l'intérieur d'une chambre à distribution en nuages peut avoir pour résultat une variance très faible entre les carrés du réseau; il suffit pour cela que la « lecture horizontale » passe par hasard à distance du nuage. Cette faible variance nous fait conclure faussement à une grande précision de la moyenne, c'est-à-dire à une dispersion normale des organismes. Par l'échantillonnage au hasard la surface entière de la chambre est touchée de façon à révéler la variance réelle qui existe dans le sédiment. Les tableaux 26.1 et 26.2 résument les analyses de variance des différents dénombrements du tableau 25.1 et 25.2.

La variance à l'intérieur des préparations augmente au fur et à mesure que la surface examinée s'étend. La variance à l'intérieur de la chambre entière est significativement plus élevée dans les sédiments à répartition non fortuite que dans les sédiments répartis normalement. ($F = 1{,}953$ avec $F_{0,05} = 1{,}0$.) On voit dans ce tableau que dans un sédiment mal réparti, l'échantillonnage systématique fournit une

TABLEAUX 26.1 ET 26.2

Analyses de variance des dénombrements suivant différents modes d'échantillonnage : a) *horizontal,* b) *horizontal + vertical,* c) *diagonales,* d) *au hasard (système* A*),* e) *au hasard (système* B*),* f) *dénombrement de la chambre entière*

* DL = *2,* ** DL = *1464*

Sédiment à répartition quasi-fortuite

Source de variance	*DL*	Variance — Système d'échantillonnage					
		a)	*b)*	*c)*	*d)*	*e)*	*f)*
Entre préparations . .	2	4,31	7,85	6,51	1,92	2,01	5,06 *
Entre carrés à l'intérieur des préparations . .	297	2,95	3,85	3,68	3,33	3,32	3,86 **

Sédiment à répartition non-fortuite

Entre préparations . .	2	2,92	3,07	2,03	1,57	1,56	4,15 *
Entre carrés à l'intérieur des préparations . .	297	3,27	5,33	4,82	7,25	7,06	7,55 **

variance qui est de moitié trop faible; la variance obtenue par l'échantillonnage au hasard est conforme.

VII. MÉTHODES OPTIMALES

VII. 1. L'EFFICACITÉ DU DÉNOMBREMENT

L'efficacité du dénombrement dépend des valeurs de précision et d'économie, fournies par un dénombrement quelconque. L'une et l'autre peuvent être augmentées empiriquement par la multiplication des essais, et théoriquement par l'établissement des valeurs de variance.

VII. 1.1. *Calcul de l'efficacité*

A l'intérieur d'une préparation, le dénombrement partiel donnera toujours des valeurs susceptibles de varier selon la répartition des organismes sur la surface de sédimentation. La variance entre carrés du réseau est une estimation de cette variabilité. A cette variabilité intérieure s'ajoute l'erreur de la préparation, ou « variance entre préparations ». Celle-ci peut être importante: en examinant plusieurs exemples

d'analyses de variance de dénombrements faits à partir d'un même échantillon, nous trouvons pour trois méthodes différentes de préparation que la variance entre préparations est plus grande que celle à l'intérieur des préparations (tableau 27):

TABLEAU 27

Analyses de variance de dénombrements de Synedra ulna *par différentes méthodes de dénombrement, et de préparation des chambres*

* = Variance entre préparations significativement plus élevée qu'à l'intérieur des préparations.

Méthode de préparation de la chambre	Source de variance	*DL*	Variance	*F*	$F_{0,05}$
Chambre combinée de 50 ml	Préparations	3	14,35	2,60*	2,61
	Intérieure aux préparations	414	5,52		
Chambre à plaques, Concentré par décantation	Préparations	3	9,03	6,1*	2,61
	Intérieure aux préparations	1121	1,48		
Chambre à plaques, Concentré par centrifugation	Préparations	3	34,7	16,8*	2,61
	Intérieure aux préparations	964	2,07		
Filtration par membrane (Ultrafiltration)	Préparations	3	5,45	1,86	2,61
	Intérieure aux préparations	646	2,93		

Des quatre modes différents de préparer le dénombrement, seule l'ultrafiltration n'ajoute qu'une erreur insignifiante à la variance intérieure.

Ces exemples montrent clairement qu'un résultat valable ne s'obtient que par le dénombrement de plusieurs chambres ou préparations différentes. Toutefois, il n'est pas utile de dénombrer dans chaque chambre le sédiment entier. Pour chercher le maximum de précision, il faut tenir compte de plusieurs facteurs:

a) le temps disponible pour le dénombrement (= « frais du dénombrement »);

b) les dimensions de la fraction du sédiment nécessaire au dénombrement, par exemple le nombre de carrés à dénombrer;

c) le nombre de préparations à faire de la chambre.

La relation entre ces trois facteurs a été développée dans un travail antérieur (UEHLINGER & LINDER 1955), dont nous rappelons en bref les données essentielles:

Si

σ_p^2 = composante de la variance entre préparations,
σ_c^2 = composante de la variance à l'intérieur des préparations, entre les carrés du réseau,

et

N_p = nombre de chambres à préparer,
N_c = nombre de carrés à dénombrer dans chaque chambre,

nous pouvons établir à l'aide d'une analyse de variance les relations suivantes:

$$CM \text{ à l'intérieur des préparations} = \sigma_c^2$$
$$CM \text{ entre préparations} = N_c.\sigma_p^2 + \sigma_c^2,$$

donc

$$\sigma_p^2 = (CM \text{ entre préparations} - \sigma_c^2)/N_c\,. \tag{1}$$

La *variance* $\sigma_{\bar{x}}^2$ de la moyenne totale $\bar{x}$ est évaluée par

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = (\sigma_c^2 + \mathrm{N}_c\,.\,\sigma_p^2)\,/\,\mathrm{N}_c\mathrm{N}_p\,. \tag{2}$$

L'information, ou *précision*, est définie par l'inverse de cette variance:

$$1/\sigma_{\bar{x}}^2 = \mathrm{N}_c\mathrm{N}_p/(\sigma_c^2 + \mathrm{N}_c\sigma_p^2) \tag{2a}$$

Si, d'autre part:

K_c = temps moyen pour le dénombrement d'un carré, et
K_p = temps nécessaire pour la préparation d'une chambre à dénombrer,

le temps K utilisé pour le dénombrement complet est

$$\mathrm{K} = \mathrm{N}_p(\mathrm{K}_p + \mathrm{N}_c\,.\,\mathrm{K}_c). \tag{3}$$

L'information par unité de temps est égale à

$$\frac{1/\sigma_{\bar{x}}^2}{\mathrm{K}} = \mathrm{N}_c/(\sigma_c^2 + \mathrm{N}_c\cdot\sigma_p^2)\cdot(\mathrm{K}_p + \mathrm{N}_c\cdot\mathrm{K}_c) \tag{4}$$

Cette relation (4) nous montre que l'information par unité de temps dépend seulement du nombre de carrés dénombrés par chambre, pour des σ_c^2 et σ_p^2, et des temps K_p et K_c donnés.

VII. 1.2. *Recherche de la précision optimale*

Pour trouver le nombre minimal de carrés à dénombrer $N_{c,\,\text{min.}}$, minimum correspondant au maximum de précision obtenue par unité de temps, nous cherchons la valeur de N_c qui correspond au maximum de la fonction $\frac{1/\sigma_{\bar{x}}^2}{K}$. La figure 16 représente

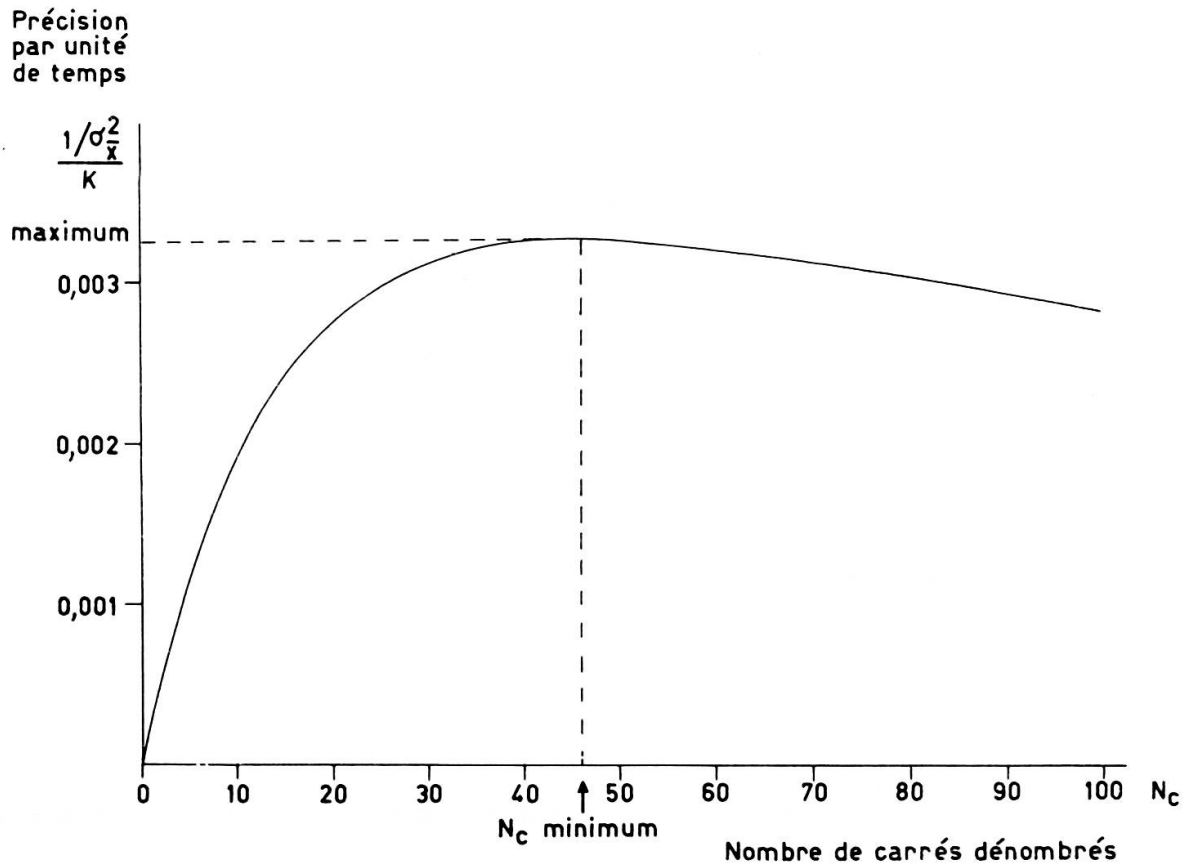


Fig. 16

Augmentation de la précision par unité de temps, en fonction du nombre de carrés dénombrés dans la chambre (formule 4).

$\sigma_{\bar{x}}^2$ = variance de la moyenne
K = temps de dénombrement
N_c = nombre de carrés dénombrés.

cette fonction (cf. formule 4), dans le cas où nous avons trouvé (dénombrement en chambre combinée) pour les composantes de la variance:

entre carrés d'une préparation: $\sigma_c^2 = 5{,}758$
entre préparations: $\sigma_p^2 = 0{,}164$

pour le temps moyen nécessaire à

la préparation d'une chambre: $K_p = 600$ sec
dénombrement d'un carré: $K_c = 10$ sec.

Les temps K_p et K_c se déterminent par des mesures répétées et représentent des moyennes.

Au début, la courbe (fig. 16) s'élève rapidement par rapport au nombre de carrés dénombrés; le maximum ne s'atteint que très lentement. Peu avant le maximum, la précision n'augmente qu'avec une forte augmentation du nombre de carrés dénombrés N_c. En déterminant ainsi dans une préparation le nombre de carrés à dénombrer, il est indiqué de choisir une valeur N_c plutôt plus petite que celle qui correspond au maximum de la fonction. Dans l'exemple ci-dessus, la moitié de $\frac{1/\sigma_{\bar{x}}^2}{K}$ est déjà atteinte avec $N_c = 8$ carrés, 3/4 avec 16 carrés, 7/8 avec 29 carrés et le maximum seulement avec 46 carrés.

Algébriquement, la valeur du N_c qui correspond au maximum de précision $\frac{1/\sigma_{\bar{x}}^2}{K}$, et que nous désignons par $N_{c.\ minimum}$, s'obtient par la relation suivante:

$$\frac{d}{dN_c}\left(\frac{1/\sigma_{\bar{x}}^2}{K}\right) = 0,$$

ce qui donne, avec la relation (4),

$$N_{c,\ min.} = \sqrt{\frac{K_p \cdot \sigma_c^2}{K_c \cdot \sigma_p^2}}. \tag{5}$$

En dénombrant un plus grand nombre de carrés, l'information par unité de temps n'augmente plus.

Avec ce $N_{c,\ minimum}$ de carrés à dénombrer dans une chambre, nous pouvons calculer le nombre de répétitions possibles dans un temps K donné d'avance, pour le dénombrement complet (cf. form. 3):

$$N_{p,\ min.} = K/(K_p + K_c N_{c.\ min.}) \tag{6}$$

La formule (5) montre à l'évidence que le nombre de carrés à dénombrer dans une préparation et, ensuite, le nombre de chambres à préparer, dépendent de deux rapports:

1° si le rapport σ_c^2/σ_p^2 augmente, c'est-à-dire si la variance entre carrés σ_c^2 augmente, ou si la variance entre préparations σ_p^2 diminue, le nombre de carrés à dénombrer dans une chambre augmentera également;

2° si le rapport K_p/K_c augmente, c'est-à-dire si le temps nécessaire pour le dénombrement d'un carré diminue, ou si le temps que nécessite la préparation d'une chambre augmente, le nombre de carrés à dénombrer augmente aussi. Il importe de se rendre compte que le temps nécessaire pour le dénombrement d'un carré dépend de la densité des organismes dans le sédiment; le temps nécessaire pour dénombrer $2n$ organismes sera légèrement supérieur à celui nécessaire pour dénombrer deux fois $1n$ organismes, en raison du retard apporté par l'enchevêtrement.

La fonction (5) peut être représentée graphiquement sous forme d'un nomogramme qui permet ensuite de déterminer rapidement le nombre le plus favorable de carrés à dénombrer. La planche III donne les valeurs de $N_{c,\,\text{min.}}$ variant de 10 à 400 pour des K_c/K_p allant de 0,01 à 10.000 et des σ_c^2/σ_p^2 allant de 10 à 10.000.

Exemple:

L'estimation de la densité de *Synedra ulna* dans un échantillon a été faite par le dénombrement complet de quatre chambres combinées de 50 ml. L'analyse de variance (tabl. 28) fournit les valeurs de σ_c^2 et de σ_p^2 selon formule (1):

TABLEAU 28

Analyse de variance de quatre comptages de Synedra ulna

Source de variance	*DL*	*SC*	*CM* = variance	Estimation de
Préparations	3	258,16	86,053	$\sigma_c^2 + 489\,\sigma_p^2$
Carrés du réseau	1952	11239,84	5,758	σ_c^2
Total	1955	11498,0		

La variance entre carrés à l'intérieur des chambres $\sigma_c^2 = 5{,}758$.
La variance due aux préparations $\sigma_p^2 = 0{,}164$ (cf. form. 1).

Les temps nécessaires pour préparer une chambre à dénombrer et le temps moyen pour dénombrer un carré du réseau, ont été mesurés chronométriquement:

$$K_p = 15 \text{ min.} = 900 \text{ secondes}$$
$$K_c = 6 \text{ sec.}$$

Les quatre chambres à 489 carrés représentent donc un temps total de

$$K = 4\,(489.6+900) = 15.336 \text{ secondes.}$$

Ces valeurs donnent les rapports suivants:

$$K_p/K_c = 150$$
$$\sigma_c^2/\sigma_p^2 = 35{,}1$$

Selon la formule (5), on calcule le nombre minimum de carrés à dénombrer:

$$N_{c,\,min,} = 72{,}6 \text{ carrés/chambre.}$$

Au lieu de faire ce dernier calcul, on peut trouver la valeur de $N_{c,\,min.}$ à l'aide du nomogramme planche III.

Dans le temps K, utilisé pour préparer les quatre chambres et pour les dénombrer complètement, on aurait pu préparer

$$K/(K_c \,.\, N_{c,\,min.} + K_p) = 11{,}5 \text{ chambres}$$

en ne dénombrant que 72,6 carrés dans chaque chambre. Pratiquement l'on choisit les valeurs entières: 12 chambres avec 70 carrés chacune.

Cette seconde modalité apporte, pour une même durée, une forte augmentation de la précision. Elle peut être mise en évidence par la comparaison des variances de la moyenne:

Moyenne d'organismes/carré $= \bar{x} = 4{,}50$.

a) 4 chambres avec 489 carrés:

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{CM \text{ entre préparations}}{\text{total des carrés}} = 86{,}05/1956 = 0{,}044 \;;$$

b) 12 chambres avec 70 carrés:

$$\sigma_{\bar{x},min.}^2 = 17{,}238/840 = 0{,}021 \;.$$

Il se trouve que dans la deuxième disposition, la variance de la moyenne totale est moins que la moitié de la première, de sorte que la précision a plus que doublé, sans qu'on ait augmenté le temps utilisé pour le dénombrement total.

La condition de base de ces considérations est la répartition au hasard des individus dans le sédiment. Dès que des facteurs externes peuvent influencer la structure du sédiment, il est indispensable de choisir au hasard sur toute la surface du sédiment, les carrés dont le nombre minimum $N_{c.\,min.}$ vient d'être déterminé.

VII. 1.3. *Recherche de l'économie optimale*

Il se peut que la précision fournie par un procédé quelconque de dénombrement ait été jugée suffisante et qu'une augmentation de la précision ne soit pas recherchée.

L'augmentation de précision obtenue par la détermination du $N_{c.\,min.}$ peut alors être transformée en une économie de temps.

Nous avons vu que la variance de la moyenne s'exprime par

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = (\sigma_c^2 + N_c \cdot \sigma_p^2)/N_c N_p .$$

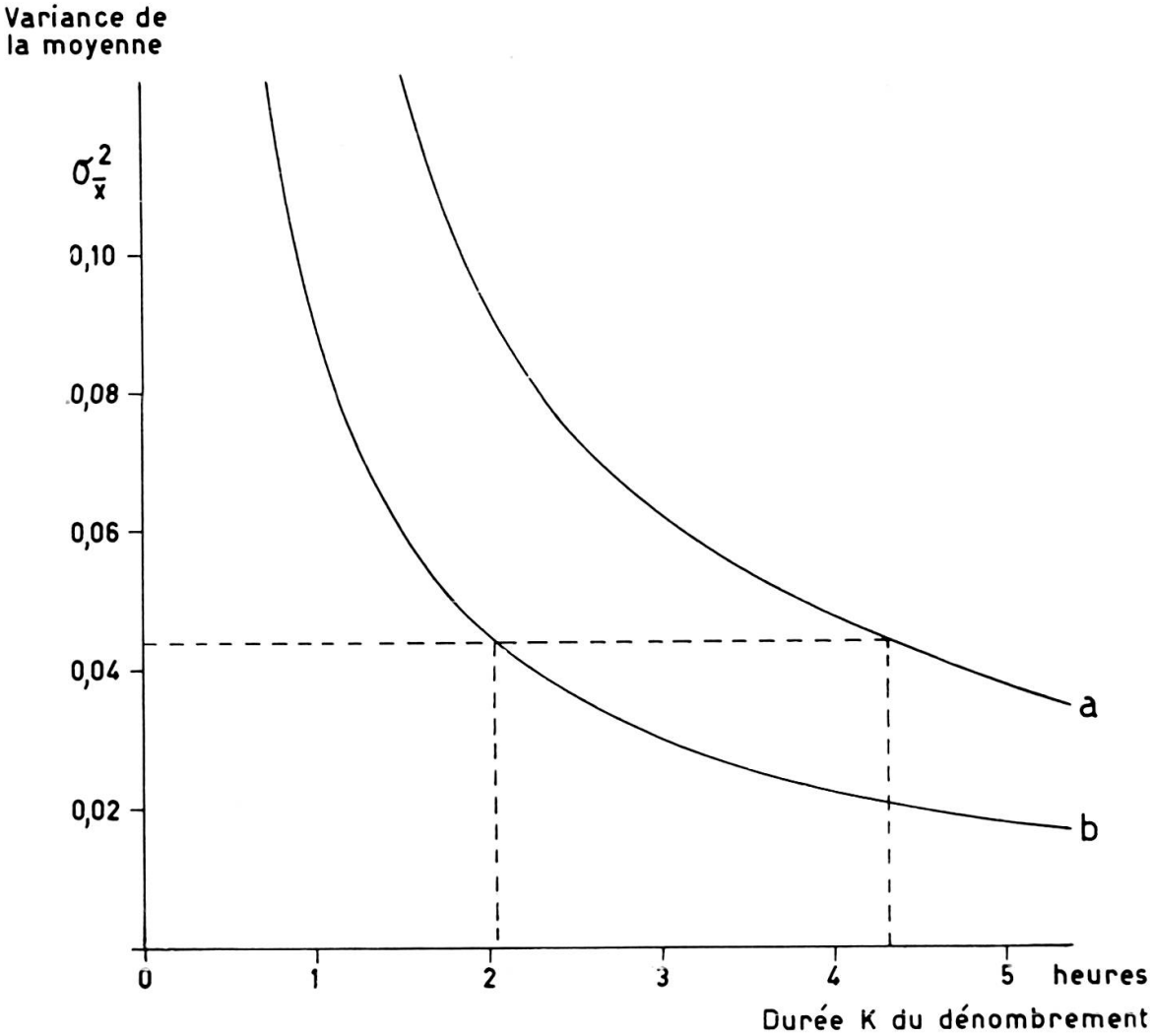


Fig. 17

Diminution de la variance $\sigma_{\bar{x}}^2$ de la moyenne, en fonction du temps utilisé pour le dénombrement entier:

a) $\sigma_{\bar{x}}^2$ pour le dénombrement complet de quatre chambres en 4,26 heures

b) $\sigma_{\bar{x}}^2$ pour les conditions optimales, en 2,05 heures.

Le nombre de préparations à examiner, N_p dépend du temps mis pour le dénombrement par la relation

$$N_p = K/(K_p + N_c K_c).$$

En remplaçant le N_p dans la première relation, on obtient comme temps total nécessaire au dénombrement:

$$K = (\sigma_c^2 + N_c \cdot \sigma_p^2)(K_p/N_c + K_c)/\sigma_{\bar{x}}^2.$$

La figure 17 représente cette fonction pour l'exemple du § VII. 1.1, comprenant les valeurs suivantes:

$$\sigma_c^2 = 5{,}758 \qquad K_p = 900 \text{ sec.}$$
$$\sigma_p^2 = 0{,}164 \qquad K_c = \quad 6 \text{ sec.}$$

Deux courbes sont dessinées:

a) En dénombrant quatre chambres en entier avec 489 carrés: la précision $\bar{x} = 0{,}044$ est obtenue en 15.336 sec. = 4,26 heures (courbe *a*);

b) En dénombrant les chambres avec 72 carrés chacune: la précision $\bar{x} = 0{,}044$ est obtenue en 7.386 secondes = 2,05 heures (courbe *b*); ce temps permet de faire cinq à six préparations de chambres à dénombrer.

La même précision peut ainsi être obtenue dans la moitié du temps. Cet exemple montre combien il est important de connaître la qualité des préparations ainsi que la variabilité à l'intérieur de chaque préparation. Pour des dénombrements répétés, il vaut toujours la peine de consacrer quelques heures ou même quelques jours à la détermination des différentes variances, pour pouvoir ensuite travailler dans les conditions minimales de temps, ou maximales de précision.

VII. 1.4. *Application des données précédentes à différentes méthodes de dénombrement.*

Appliquons les procédés des paragraphes précédents à l'expérience décrite au § V. 3 (différentes méthodes de concentration et différentes chambres à dénombrer, utilisées pour examiner une même suspension). On peut alors chercher les valeurs optimum pour chaque méthode du tableau 19. 1.

En supposant trois heures disponibles (10.800 sec.) pour le dénombrement complet, les nombres de chambres à préparer sont calculés à l'aide des $N_{c,\min.}$ déterminés auparavant. Pratiquement, certaines combinaisons sont irréalisables: pour le cas des chambres tubulaires, par exemple, il faudrait disposer de douze chambres tubulaires pour une seule expérience. Par ailleurs, la précision, exprimée par le coefficient de variation de la moyenne, serait inutilement grande ($CV_{\bar{x}} = 3{,}62\,\%$). $CV_{\bar{x}} = 20\,\%$ de précision suffiraient et permettraient d'effectuer le dénombrement de deux chambres chacune avec 95 carrés en un peu plus d'une demi-heure. Il est intéressant de noter qu'en général le nombre optimum N_c se trouve autour de 100 carrés (mm^2), c'est-à-dire un cinquième de la surface totale. La détermination des conditions optimales montre que la précision fournie par la combinaison des méthodes Utermoehl avec les méthodes de décantation est du même ordre pour les autres combinaisons de comptage. La centrifugation, par contre, ne fournit que la moitié de cette précision, même dans les meilleures conditions de dénombrement.

TABLEAU 29

Nombre optimum de carrés à dénombrer dans différentes chambres préparées avec différentes méthodes de concentration

K_p = temps nécessaire à la préparation d'une chambre
K_c = temps nécessaire au dénombrement d'un carré du réseau
N_c = nombre optimum de carrés à compter
N_p = nombre de préparations possibles en 3 heures
$CV_{\bar{x}}$ = coefficient de variation de la moyenne dans les conditions optimales

Méthode de concentration	Utermoehl	Décantation	Centrifugation
Chambre tubulaire, Microscope renversé	σ_c^2/σ_p^2 = 46,556 K_p = 600 sec. K_c = 3 sec. K_p/K_c = 200 N_c = 95 N_p = 12 $CV_{\bar{x}}$ = 3,62 %	—	—
Chambre combinée ou à plaques, Microscope renversé	σ_c^2/σ_p^2 = 35,1 K_p = 900 sec. K_c = 6 sec. K_p/K_c = 150 N_c = 70 N_p = 12 $CV_{\bar{x}}$ = 3,69 %	σ_c^2/σ_p^2 = 42,9 K_p = 900 sec. K_c = 3 sec. K_p/K_c = 300 N_c = 120 N_p = 9 $CV_{\bar{x}}$ = 4,72 %	σ_c^2/σ_p^2 = 15,36 K_p = 1200 sec. K_c = 3 sec. K_p/K_c = 600 N_c = 95 N_p = 7 $CV_{\bar{x}}$ = 8,98 %
Chambre combinée ou à plaques, Microscope normal	σ_c^2/σ_p^2 = 35,76 K_p = 900 sec. K_c = 6 sec. K_p/K_c = 150 N_c = 70 N_p = 8 $CV_{\bar{x}}$ = 2,02 %	σ_c^2/σ_p^2 = 116,32 K_p = 900 sec. K_c = 3 sec. K_p/K_c = 300 N_c = 180 N_p = 8 $CV_{\bar{x}}$ = 3,29 %	σ_c^2/σ_p^2 = 12,65 K_p = 1200 sec. K_c = 3 sec. K_p/K_c = 600 N_c = 85 N_p = 7 $CV_{\bar{x}}$ = 8,56 %
Chambre *) Sedgewick-Rafter, Microscope normal	σ_c^2/σ_p^2 = 4,153 K_p = 900 sec. K_c = 45 sec. K_p/K_c = 20 N_c = 10 N_p = 8 $CV_{\bar{x}}$ = 3,90 %	σ_c^2/σ_p^2 = 16,74 K_p = 600 sec. K_c = 30 sec. K_p/K_c = 20 N_c = 18 N_p = 9 $CV_{\bar{x}}$ = 2,79 %	σ_c^2/σ_p^2 = 2,24 K_p = 1200 sec. K_c = 30 sec. K_p/K_c = 40 N_c = 10 N_p = 7 $CV_{\bar{x}}$ = 5,03 %
Ultrafiltration Comptage sur membrane	σ_c^2/σ_p^2 = 189,03 K_p = 3600 sec. K_c = 4 sec. K_p/K_c = 900 N_c = 300 N_p = 2 $CV_{\bar{x}}$ = 4,25 %	—	—

*) Dans la chambre Sedgewick-Rafter, la densité des organismes est comparativement plus faible par unité de surface; au lieu de carrés de 1 mm², des lignes de 10 mm² furent dénombrées.

VII. 2. Limitation du nombre d'organismes a dénombrer

Par la détermination de l'efficacité du dénombrement (§ VII. 1), on peut trouver, pour une espèce donnée, le nombre optimal d'aires à dénombrer. Ces considérations ne sont valables que dans le cas d'une densité limitée à 0-10 individus/unité de surface en moyenne. La nécessité de dénombrer plusieurs espèces différentes dans le même échantillon, pose le problème de la limitation du nombre d'individus à dénombrer dans chaque espèce. On cherchera donc le nombre minimum d'individus à dénombrer au lieu du nombre minimum de carrés à dénombrer.

On connaît, pour la répartition selon Poisson, les limites fiduciaires pour n'importe quel nombre d'organismes dénombrés, ces valeurs étant indépendantes des dimensions de la surface examinée: voir planche I*b*. En supposant une répartition selon Poisson dans le sédiment, le nombre d'individus à dénombrer peut être choisi selon la précision désirée. La transformation du nombre obtenu en nombre d'organismes par unité de volume est possible grâce à l'enregistrement de la surface correspondant au nombre d'individus dénombrés.

Javornicky (1958), à l'aide de la formule

$$z = 4/k^2$$

où z = nombre d'organismes à dénombrer, et
k = limite de précision choisie, exprimée en fractions (p. ex. 10% = 0,1 = k)

se limite à dénombrer 400 individus pour obtenir une précision de ± 10%.

Les deux manières de déterminer le nombre d'individus à dénombrer dépendent de certaines conditions:

1° de la distribution du sédiment dans la chambre (fortuite ou non),

2° de la manière de choisir les aires dans lesquelles les individus sont dénombrés,

3° de la représentativité d'une préparation, c'est-à-dire de la variabilité entre chambres.

VII. 2.1. *Choix dans des sédiments répartis au hasard*

Si la variance à l'intérieur du sédiment excède la moyenne (s^2 $\bar{x}$), contrôlé au moyen du critère du χ^2_{variance} les limites théoriques sont trop faibles. Comme nous avons vu au § VI. 2.1, la répartition des organismes dans le sédiment est rarement fortuite. Si la préparation est faite avec soin, la déviation n'est toutefois pas excessive; par exemple, dans la comparaison des chambres préparées soit avec un échantillon tempéré, soit avec un échantillon froid, le dénombrement des *Synedra ulna* donne le tableau suivant:

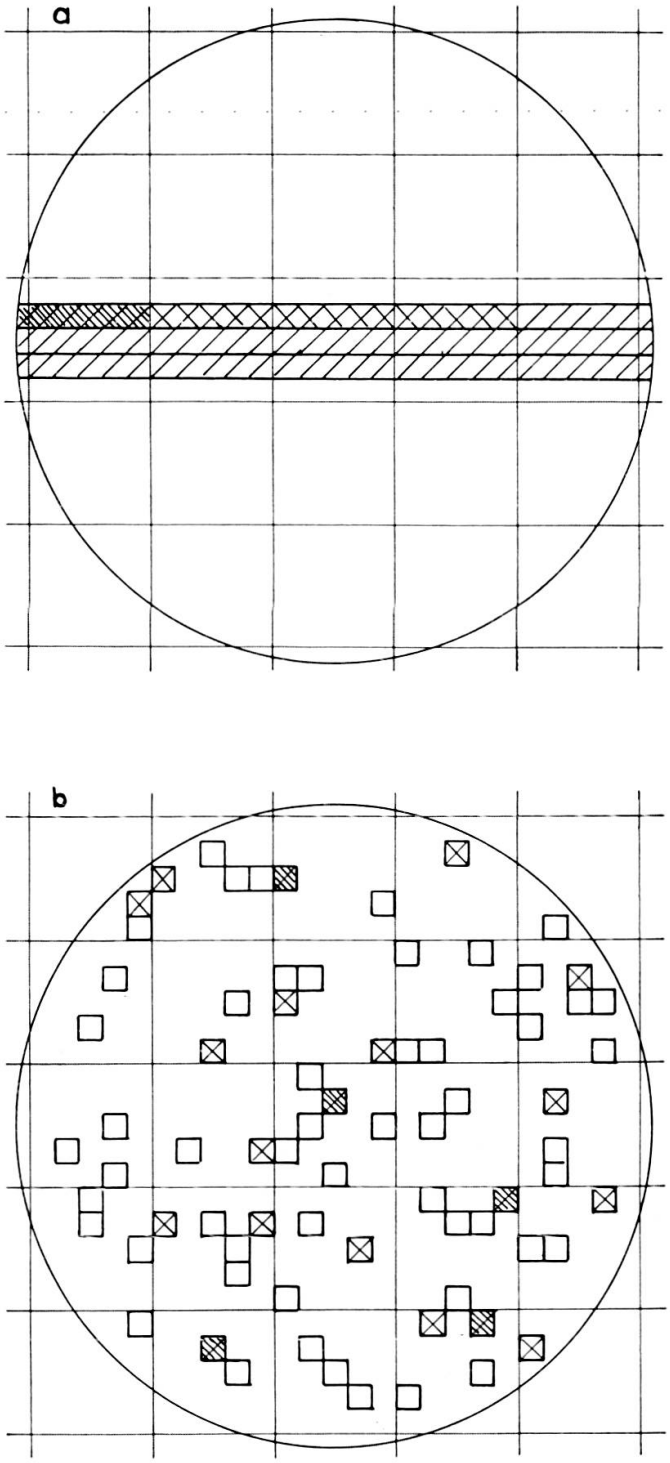


Fig. 18

Dénombrement partiel jusqu'à un nombre limite:

18 *a*: procédé systématique
18 *b*: procédé au hasard.

espèce fréquente

espèce moins fréquente

espèce peu fréquente

TABLEAU 31

Variance à l'intérieur des chambres à répartition fortuite ou non, pour un dénombrement de Synedra ulna

Préparation n°	Nombre d'individus dénombrés	Individus/mm²	s^2	χ^2
Sédiment à répartition presque fortuite:				
1	1328	2,72	3,48	624
2	1426	2,92	4,13	691
3	1362	2,79	3,98	697
Sédiment à répartition non fortuite:				
1	1178	2,41	8,72	1736
2	1268	2,59	8,46	1592
3	1219	2,49	5,46	970

Avec une mauvaise répartition, la variance s^2 atteint le double ou même le triple de la moyenne. Dans un cas semblable, le choix d'un nombre limite selon les principes de Poisson est impossible. Dans le cas d'une répartition presque fortuite, le nombre choisi suivant les limites de Poisson peut indiquer un minimum, au-dessous duquel la précision sera insuffisante.

VII. 2.2. *Choix des aires de surface à dénombrer dans des répartitions non fortuites*

Après avoir choisi un nombre d'individus minimum à dénombrer, il faut choisir les aires de surface de sédimentation à l'intérieur de la chambre, de façon à permettre l'interruption du comptage au moment où le nombre fixé est atteint; dans un système d'échantillonnage systématique dans le sédiment, le procédé illustré par la figure 18 est utilisé: dans une bande horizontale traversant la chambre, l'on commence à dénombrer les individus par unité de surface (millimètres carrés, par exemple). Le dénombrement d'une espèce est interrompu quand le minimum est atteint; le dénombrement des autres espèces continue jusqu'au nombre limite imposé. En déterminant le nombre d'unités de surface sur laquelle se trouvait ce nombre limite d'individus, on en calcule la densité dans la chambre entière. Comme nous avons constaté au § VI. 3.1, le dénombrement suivant un système systématique comprend quelques risques d'erreurs de principe. L'échantillonnage selon un système de choix des carrés au hasard diminue ces erreurs. Toutefois, pour pouvoir interrompre le dénombrement à n'importe quel moment, il ne suffit pas d'établir une grille de carrés disposés au hasard et de la remplir ensuite de haut en bas, mais il faut établir l'ordre chronologique suivant lequel les carrés sont à dénombrer (figure 13*d*, p. ...).

Pratiquement, l'on prépare plusieurs grilles contenant chacune 10 ou 20 carrés numérotés, que l'on applique l'une après l'autre (cf. annexe II).

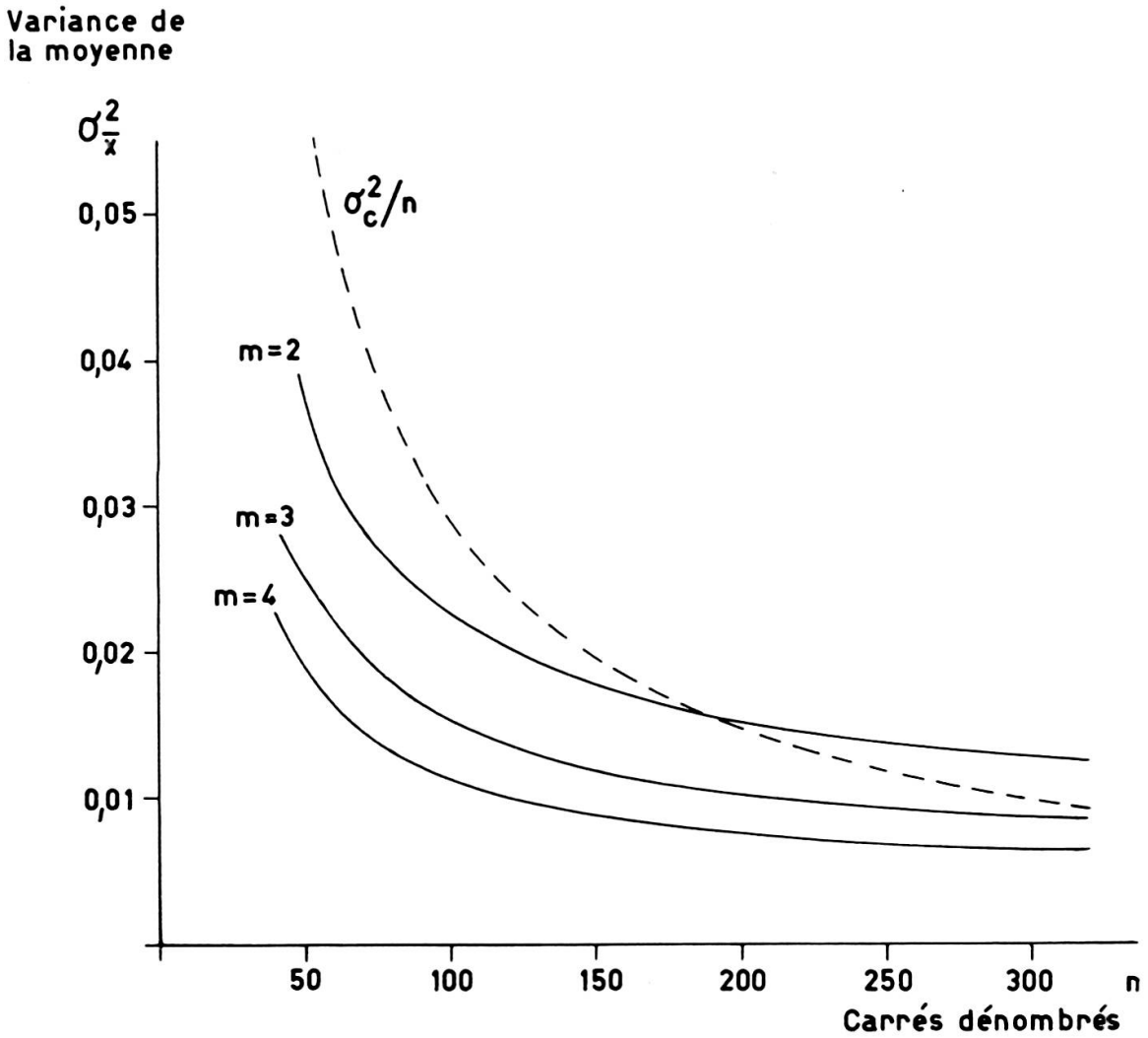


Fig. 19

Variance de la moyenne
— — — — estimée à partir de la variance entre carrés
———— estimée à partir de la variance entre préparations.
n = nombre de carrés dénombrés
m = nombre de préparations de chambres.

Fig. 19 *a*

La variance entre préparations n'excède pas la variance entre carrés du réseau.

VII. 2.3. *Variabilité entre chambres, avec plusieurs préparations*

La recherche de la meilleure estimation à l'intérieur d'une chambre n'est utile que si la chambre représente réellement l'échantillon à examiner. Les analyses de variance du § VII. 1 montrent clairement que, par rapport à la variance à l'intérieur

de la chambre, la variance entre préparations répétées est très importante, significativement plus élevée. La variance de la moyenne devient ainsi plus élevée si elle est

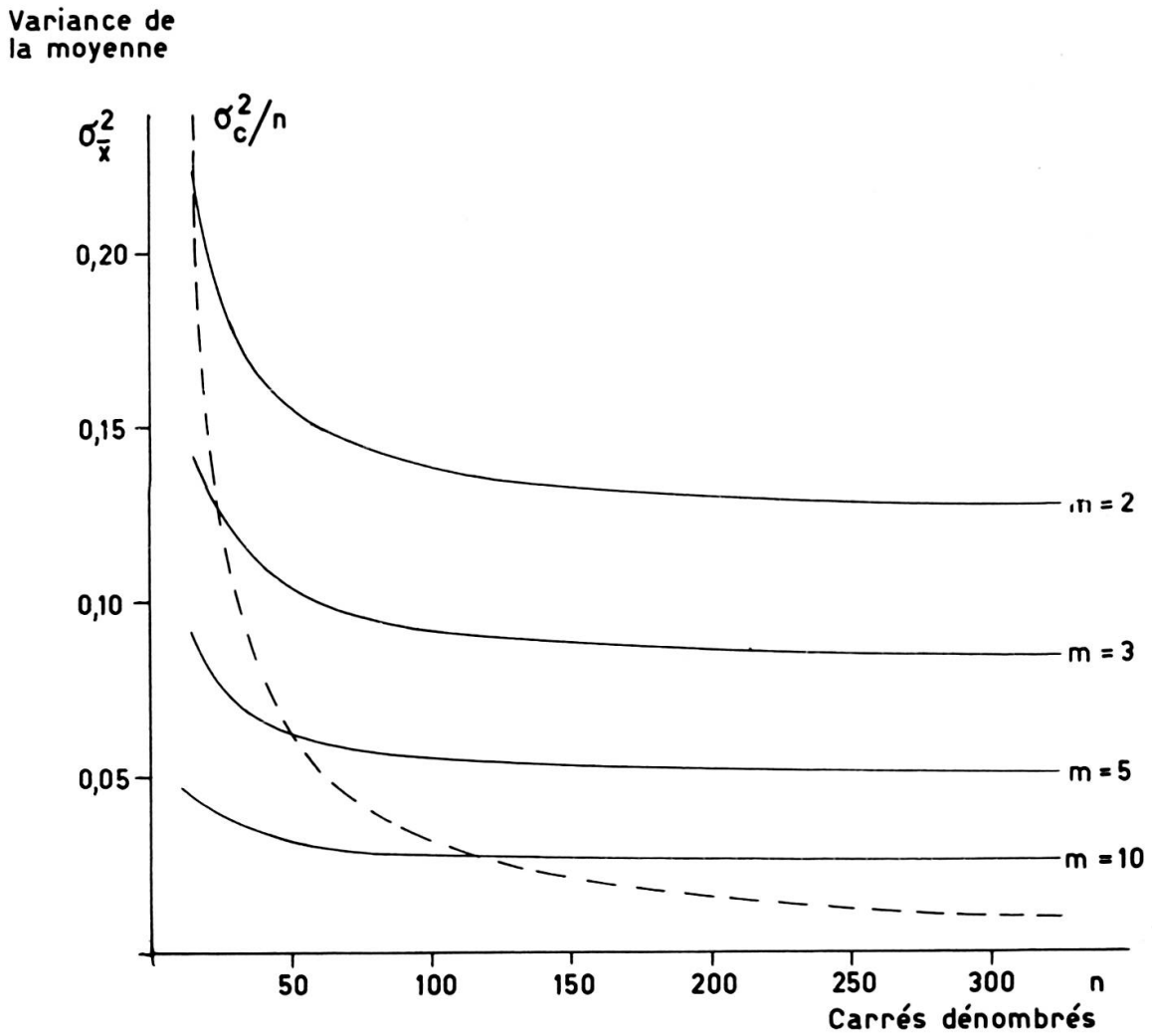


Fig. 19 *b*

La variance entre préparations est beaucoup plus élevée que la variance entre carrés du réseau.

calculée sur la base de plusieurs préparations, que si elle est estimée à partir d'une seule préparation:

a) variance de la moyenne dans une préparation:

$$s'^2_{\bar{x}} = s^2_c/n$$

où n = nombre de carrés dénombrés dans l'échantillon;

b) variance de la moyenne sur plusieurs préparations:

$$s''^2_{\bar{x}} = (s^2_c + n.s^2_p)/m.n$$

où m = nombre de chambres préparées.

L'erreur de la préparation des chambres est inclue dans la deuxième variance.

Les figures 19*a*, *b* illustrent des exemples où l'erreur introduite par la préparation, c'est-à-dire la variance entre préparations, devient toujours plus importante par rapport à la variance entre carrés à l'intérieur des chambres.

Il est évident qu'en choisissant un nombre fixe d'individus à dénombrer, la précision du résultat est beaucoup moins grande si plusieurs préparations sont examinées, mais la moyenne se rapproche davantage de sa vraie valeur. Par exemple, dans la figure 19*a*, 400 individus ont été trouvés sur 162 carrés d'une préparation. Une précision égale serait obtenue par le dénombrement de 2×140 carrés, ou de 3×80 carrés ou de 4×50 carrés. Dans le cas où la variance entre préparations dépasse fortement la variance à l'intérieur d'une préparation (fig. 19*b*) on est forcé de se contenter d'une précision inférieure à celle obtenue à l'intérieur d'une chambre, le travail devenant trop considérable par rapport au gain de précision.

Il en résulte que la vraie moyenne se trouve avec d'autant plus de précision que le nombre de préparations répétées de chambres est grand. Il est donc indispensable d'examiner deux, sinon trois préparations différentes.

VIII. 1. Résumé

La recherche d'une méthode efficace d'énumération du plancton d'eau douce — c'est-à-dire d'une méthode qui donne un maximum d'information d'une précision donnée, avec un minimum de temps et de travail —, conduit à l'analyse statistique des diverses techniques de dénombrement planctonique. L'étude des différentes étapes de la préparation, du comptage et de l'évaluation des résultats, ainsi que la comparaison des méthodes d'Utermoehl, Kolkwitz, Sedgewick-Rafter et de l'ultrafiltration, a permis de mettre en évidence les conclusions suivantes.

Echantillonnage et concentration

Les prélèvements effectués avec la bouteille Friedinger de un litre sont représentatifs pour le milieu environnant l'endroit de la pêche; les pêches ont été effectuées dans le lac Léman, plus particulièrement dans l'eau légèrement courante du bassin du Petit-Lac, pendant quarante minutes consécutives.

Un échantillon non fixé, prélevé sur le volume d'un litre, est représentatif pour le contenu de la bouteille.

Une conservation prolongée favorise la dislocation des espèces coloniales; cependant, ces espèces présentent une résistance spécifique à cette dislocation.

La mésofiltration fournit des valeurs reproductibles.

L'ultrafiltration, avec comptage direct sur la membrane filtrante, est une méthode très précise; elle est toutefois limitée aux Diatomées seules, qui résistent à la dessiccation.

La centrifugation, méthode rapide de concentration, donne des valeurs reproductibles. Toutefois, ces valeurs sont chargées d'une forte variabilité et la confiance en une unique préparation obtenue par centrifugation est limitée.

La simple décantation quantitative d'une sédimentation de vingt-quatre heures donne des échantillons reproductibles. Elle présente l'avantage d'une précision plus grande que la centrifugation, et d'un traitement moins nuisible aux organismes friables.

Chambres de dénombrement

La reproductibilité des valeurs fournies par la chambre Sedgewick-Rafter est confirmée. Le sédiment présente une distribution fortuite et permet le dénombrement partiel selon un procédé systématique.

Les chambres à forme ronde, telles que les modèles Kolkwitz et Utermoehl, fournissent des valeurs reproductibles dans le cas du dénombrement de la chambre entière. Néanmoins, le sédiment dans la chambre ne présente que très rarement une répartition fortuite des organismes. Cette répartition dépend des techniques de remplissage et des conditions thermiques pendant la sédimentation. En plus, l'irrégularité de l'image n'est pas la même pour les différentes espèces.

L'échantillonnage, la concentration et le remplissage de la chambre déterminent une variance entre chambres, qui est plus grande que la variance à l'intérieur d'un seul sédiment. Pour chaque type de chambre on peut calculer la fraction optimum du sédiment à dénombrer. Au-delà de cette fraction, toute augmentation de précision s'obtient par la répétition des préparations des chambres.

L'énumération des organismes d'une même suspension avec les diverses méthodes de dénombrement fournit des valeurs absolues légèrement différentes. Ces différences sont statistiquement significatives. Des valeurs présentées par différents investigateurs sont donc à comparer avec prudence.

Dénombrement partiel et échantillonnage dans des ensembles à répartition non fortuite

Dans le cas d'une distribution non fortuite, le dénombrement partiel du sédiment peut fournir différentes estimations de la densité, suivant la technique adoptée:

1° Densité dans quelques aires de surface choisies selon un procédé systématique,

2° Densité dans quelques aires choisies selon un système de points distribués au hasard sur toute la surface,

3° Densité dans la chambre entière, obtenue par le dénombrement de toutes les aires de la surface (« moyenne réelle »).

Ad 1°: Ce procédé systématique peut avoir pour résultat une moyenne très éloignée de la moyenne réelle. Calculant progressivement les moyennes au cours du

dénombrement, on obtient des valeurs qui oscillent autour de la moyenne réelle, sans y confiner. De plus, la variance observée est quelquefois trop faible.

Ad 2°: L'échantillonnage des aires à dénombrer, selon un système de points choisis au hasard établi préalablement, a pour résultat une moyenne qui se rapproche progressivement de la moyenne réelle, au cours du dénombrement. La variance entre ces aires correspond à la variance réelle de la préparation.

En général, le procédé suivant donnera, avec un minimum de travail, des résultats statistiquement valables:

1) Préparation de deux chambres à dénombrer (le type de la chambre et le procédé de concentration sont choisis suivant les besoins de l'expérience).
2) Détermination du nombre maximum d'individus à dénombrer dans chaque espèce, ou de la fraction du sédiment à examiner, suivant les principes développés dans le § VII.
3) Dénombrement des organismes dans plusieurs aires de surface, préalablement choisis au hasard dans toute la chambre (cf. § VI. 3.1).
4) Enregistrement des fréquences observées et du nombre d'unités de surface examinées (cf. § VI. 1).
5) Transformation de ces valeurs en une estimation de la densité de l'échantillon étudié, à l'aide d'un nomogramme approprié (cf. § VI. 1).

Annexes

I. Liste des formules statistiques utilisées dans ce travail, avec quelques remarques concernant leur emploi.

II. Deux systèmes de points répartis au hasard sur une surface circulaire de vingt-cinq unités de diamètre.

III. Nomogrammes pour la conversion des résultats de comptage en une estimation de densité.

VIII. 1.1. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde versucht, ein Zählverfahren für Süsswasserplankton zu finden, welches bei gegebener Genauigkeit für ein Mindestmass an Arbeit, ein Höchstmass an Auskunft gibt. Dies führte zur statistischen Analyse und zum Vergleich der Methoden von Utermoehl, Kolkwitz, Sedgewick-Rafter und der Ultrafiltration, wobei die einzelnen Vorbereitungsstufen, das Zählen selbst und die Auswertung der Zählergebnisse untersucht wurden. Im einzelnen sind folgende Punkte beachtenswert:

Stichproben und Eindichtung

An gleichbleibendem Entnahmeort, im westlichen Endteil des Genfersees, und trotz leicht fliessendem Wasser, liefert die 1-Liter Friedinger-Flasche, während mehr als 40 Minuten, Zufallsstichproben.

Unfixierte Proben dieses Flascheninhalts sind wiederum Zufallsstichproben.

In mit Lugol'scher Lösung fixierten Proben führt längeres Aufbewahren zur Auflösung der Kolonien. Die Auflösungsgeschwindigkeit hängt stark von der Planktonart ab.

Die Mesofiltration gibt wiederholbare Ergebnisse.

Die Ultrafiltration, mit direkter Auszählung auf der Membran, ist ein sehr genaues Schätzungsverfahren. Es eignet sich jedoch nur für die dem Austrocknen widerstehenden Diatomeen.

Zentrifugenproben sind Zufallsstichproben; sie sind jedoch mit einer grossen Streuung behaftet. Die Auszählung einer einzelnen Zentrifugenprobe gibt eine wenig sichere Schätzung der Planktondichte. Auch widerstehen die Kolonien gewisser Arten dieser Behandlung schlecht.

Ein behutsameres Verfahren ist das einfache Absinkenlassen während 24 Stunden im Messzylinder, mit nachfolgendem Absaugen des überstehenden Wassers. Dieses Eindichtungsverfahren ist ausserdem genauer als das Zentrifugieren.

Zählkammern

Die Sedgewick-Rafter Kammer gibt zufällig streuende Ergebnisse. Die Organismen sind zufällig auf der ganzen Kammerfläche verteilt.

In runden Kammern (Utermoehl und Kolkwitz) ergibt die Auszählung der ganzen Kammer zufällig streuende Werte. Die Verteilung der Organismen auf dem Kammerboden ist jedoch selten rein zufällig. Fülltechnik und Wärmeverhältnisse während des Absinkens beeinflussen das Verteilungsmuster. Die Unregelmässigkeit des Musters hängt ausserdem von der Art der Organismen ab.

Die durch Stichprobenentnahme, Eindichtung und Füllung der Kammer verursachte Streuungskomponente ist in wiederholten Auszählungen verhältnismässig grösser als die Streuungskomponente innerhalb der Kammern. Das zweckmässigste Verhältniss zwischen dem auszuzählenden Teil einer Kammer und der Anzahl zu untersuchenden Kammern kann berechnet werden. In einem, ein für alle Mal aufgezeichneten Nomogramm können diese Werte auch abgelesen werden.

Wird eine Wasserprobe mit verschiedenen Kammerverfahren untersucht, so ergeben sich kleine, aber statistisch gesicherte Unterschiede zwischen den Schätzungen. Absolute Werte verschiedener Untersucher können deshalb nicht ohne weiteres verglichen werden.

Teilzählungen, und Stichproben aus nicht zufällig verteilten Grundgesamtheiten

Mit verschiedenen Chi-quadrat-Prüfverfahren kann das Verteilungsmuster in der Kammer beurteilt werden. Sind die Organismen nicht zufällig verteilt, so muss in einer Teilzählung möglichst der ganze Kammerboden beachtet werden.

Man kann den Kammerboden in Flächeneinheiten unterteilen, worin Teilzählungen, bei nicht zufälliger Anordnung der Organismen, drei verschiedene Mittelwerte liefern können:

1° Dichte in einem systematisch gewählten Teil der Kammer,

2° Dichte in zufällig über die ganze Kammer verteilten Flächeneinheiten,

3° Wirkliche Dichte in der ganzen Kammer.

Zu 1°: Diese sehr häufig angewandte Schätzung kann von dem wirklichen Wert stark abweichen. Während dem Auszählen fortschreitend berechnete Mittelwerte schwanken stark um den wirklichen Wert, ohne sich hierauf festzusetzen. Die Streuung zwischen den Werten der einzelnen Flächeneinheiten ist manchmal viel kleiner als die wirkliche Streuung innerhalb der ganzen Kammer.

Zu 2°: Werden die auszuzählenden Flächeneinheiten auf dem ganzen Kammerboden gewählt, nach einem zum vorneherein bestimmten zufällig verteilten Punktsystem, so findet man einen Mittelwert, der sich bei fortschreitender Auszählung immer mehr dem wirklichen Wert nähert, und somit eine gute Schätzung liefert. Die Streuung ergibt ebenfalls eine richtige Schätzung der wirklichen Streuung innerhalb der Kammer.

Im allgemeinen wird folgende praktische Anwendung zufriedenstellende Ergebnisse liefern:

1) Füllung von zwei Zählkammern (Art der Kammer und des Eindichtungsverfahrens hängen von den Umständen der Untersuchung ab; siehe § V);
2) Bestimmung der Mindestzahl zu zählender Organismen oder zu untersuchender Flächeneinheiten (siehe § VII);
3) Auszählung in zufällig auf dem ganzen Kammerboden verteilten Flächeneinheiten (siehe § VI. 3.1);
4) Aufzeichnen der Zählergebnisse in Form von Häufigkeitsverteilungen (siehe § VI. 1);
5) Schätzung der Planktondichte durch Umwandlung der Zählergebnisse mit Hilfe geeigneter Nomogramme (siehe § VI. 1).

Anhang

I. Zusammenfassung der Formeln und Bemerkungen zu den in der Arbeit angewandten statistischen Methoden.

II. Zwei Systeme von zufällig verteilten Punkten auf einer Kreisfläche von 25 Durchmesser-Einheiten.

III. Nomogramme.

VIII. 1.2. Summary

In searching for the most efficient counting procedure,—i.e. the method which yields the maximum information of known accuracy with the minimum expenditure of time and labour,—a statistical analysis of the various methods available for the density estimation of freshwater plankton has been made, together with a systematic study of preparative stages and the ways of counting and testing the results. The examination of the procedures of Utermoehl, Kolkwitz, Sedgewick-Rafter and ultrafiltration has provided the following conclusions:

Sampling and Concentration

Samples collected with a 1-litre Friedinger bottle are representative of the environment sampled. The environment in this case was the slowly flowing water of the Western end of the Lake of Geneva: samples were collected in the course of half-an-hour.

Unfixed random sub-samples from the bottle are representative of the total contents.

Long preservation favours the disaggregation of colonial forms; these types show specific resistance to such disaggregation.

Results from mesofiltration are reproducible.

Ultrafiltration, combined with immediate counting on the membrane, is a very accurate method of estimation. It is, however, limited to diatoms since these alone are able to resist dessication.

Centrifugation, providing rapid concentration, gives reproducible results. These latter manifest, however, a strong variability. Density estimations as derived from a single centrifuge sample are not very reliable.

Data are presented for a simple method of decantation which may be applied to all sedimentable organisms with the production of reproducible results. This method has the advantage of being more accurate than centrifugation and less deleterious for delicate organisms.

Counting chambers

The accuracy of the results obtained with the Sedgewick-Rafter cell has been confirmed. The sediment shows a random distribution, and it is possible to estimate the mean in a part of the cell chosen by a systematic procedure.

Round chambers, such as the types Kolkwitz and Utermoehl, provide accurate results by enumeration of the whole sediment. However, this sediment seldom presents a random distribution of the organisms. The distribution itself depends on the way in which the chamber is prepared. Moreover, the pattern of non-randomness varies according to the different species present.

Errors due to sub-sampling, concentration and filling, in counts made in replicate preparations, account for more variance than the variance shown within a single cell. Consequently, a theory is given for calculating the optimum fraction of the sediment to be counted in replicate cells.

There is a slight, but statistically significant, discrepancy between the data obtained using the various methods of enumeration. The results advanced by different investigators should therefore be compared with care.

Partial counts, and Sampling in non-random distributed populations

The varying strength of the different Chi-square tests for randomness is discussed with respect to the control of the pattern of sedimentation.

Partial counting in non-randomly distributed sediments provides three possible means of density:

1° The density in some regions of the surface chosen by a systematic procedure,

2° The density in some areas chosen at random from the whole sediment,

3° The true density of the whole cell, i.e. in all regions of the sediment (the " real mean ").

Ad 1°: The sampling of areas by a system of systematically-chosen points yields a mean which is very different from the real mean. If means are calculated progressively during the process of enumeration, the results oscillate around the real mean, without necessarily touching it. Furthermore, such counts often suggest a smaller standard error than the real error of the total count.

Ad 2°: Random sampling of areas taken from the whole surface of the sediment gives a mean which approaches the total mean during the enumeration procedure. The standard error involved equals the true total error.

In practical terms, the following general procedure will give the most satisfactory results:

1) Preparation of two sub-samples for enumeration (the type of counting chamber and the method of concentration being chosen according to the needs and circumstances of the examination).

2) Determination of the minimum number of organisms to be counted for every species, or determination of the minimum number of areas to be enumerated in the sediment, following the principles as developed under § VII.

3) Counting (for each cell) up to the chosen number of organisms or areas, and at the same time applying a system of random sampling of areas on the whole surface (cf. § VI. 3.1).
4) Recording of plankton frequencies and of number of areas examined (cf. § VI. 1).
5) Transformation of these results of counting into an estimate of density by means of a suitable nomogram (cf. § VI. 1).

Appendixes contents

I. List of statistical formulas used in this paper.
II. Two systems of random distributed points on a circular surface of 25 units diameter.
III. Nomograms.

VIII. 2. Remerciements

Cette étude a été réalisée à l'Institut de Botanique générale et au Laboratoire de Statistique mathématique de l'Université de Genève. Il me reste maintenant l'agréable devoir d'exprimer ma grande reconnaissance à mes maîtres, MM. les Professeurs F. Chodat et A. Linder, qui m'ont initiée aux problèmes de l'algologie et de la biologie quantitative, et m'ont encouragée par leurs conseils et par l'intérêt qu'ils ont accordé à ce travail.

Ma reconnaissance va également au Professeur O. Jaag, directeur de l'Institut fédéral pour l'aménagement, l'épuration et la protection des eaux, à Zurich, ainsi qu'à ses collaborateurs.

Au cours des prélèvements j'ai bénéficié de l'expérience et de la compétence en planctologie de M. P. Martin, de l'Institut de Botanique générale. Qu'il en soit chaudement remercié ici.

Je suis reconnaissante à Mlles M. Schneeberger et J. Gilliéron pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée dans la préparation du manuscrit.

L'achat de matériel spécialisé a été facilité par la libéralité de la Société académique de Genève, à laquelle va ma plus vive gratitude.

VIII. 3. BIBLIOGRAPHIE

Ballantine, D. 1953: Comparison of the different methods of estimating nanoplankton. *Jour. Mar. Biol. Ass. UK. 32*, 129-147.

Barnes, H. and Marshall, S. M. 1951: On the variability of replicate plankton samples and some applications of « contagious » series to the statistical distribution of catches over restricted periods. *Jour. Mar. Biol. Ass. UK. 30*, 233-263.

BETANT, A. et PERRENOUD, G. 1932: Etudes sur la partie occidentale du Lac de Genève. *Mém. Soc. Phys. Hist. Nat., Genève, 41.*

COCHRAN, W. G. 1954: Some Methods for strengthening the common Chi²-Test. *Biometrics, 10,* 417-451.

DIETERICH, B. und STEINECKE, H. 1955: Die Bedeutung der Planktonkonzentration und deren quantitative Bestimmung in Oberflächengewässern. Vom Wasser *(Jahrb. f. Wasserchem. u. Wasserreinigungstechnik), 22,* 72-89.

FISHER, R. A. and YATES, F. 1953: *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research,* 4e éd., Oliver and Boyd, London.

GILBERT, J. Y. 1942: The errors of the Sedgewick-Rafter Counting Chamber in the enumeration of Phytoplankton. *Trans. Amer. Micr. Soc. 61,* 217-226.

GREIG-SMITH, P. 1957: *Quantitative Plant Ecology.* Butterworth, London.

GROTE, A. 1953: Beitrag zur statistischen Überprüfung quantitativer Methoden in der Limnologie. *Gewässer u. Abwässer, 5,* 33-76.

JAVORNICKY, P. 1958: The Revision of some quantitative Methods for Phytoplankton Research (English summary). *Scientif. Papers. Inst. Chem. Techn. Prague, Fac. Techn. Fuel and Water, 2,* 283-367.

JANNASCH, H. W. 1953: Weitere Mitteilung zur quantitativen Phytoplankton-Untersuchung mit Membranfiltern. *Ber. Limnol. Flusstat. Freudenthal 5,* 59-62.

KUTKUHN, J. H. 1958: Notes on the precision of numerical and volumetric plankton estimates from small-sample concentrates. *Limnol. and Oceanogr., 3,* 69-83.

LAMOTTE, M. 1957: *Initiation aux méthodes statistiques en biologie.* Masson, Paris.

LINDER, A. 1960: *Statistische Methoden.* Birkhäuser, Basel. 3e éd.

LITTLEFORD, R. A., NEWCOMBE, C. L. and SHEPHERD, B. B. 1940: An experimental study of certain quantitative plankton methods. *Ecology, 21,* 309-322.

LUND, J. W. G. and TALLING, J. F. 1957: Botanical limnological methods with special reference to the algae. *Bot. Rev. , 23,* 489-583.

—— KIPLING, C. and LE CREN, E. D. 1958: The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia, 11,* 143-170.

MOORE, E. W. 1952: The precision of microscopic counts of plankton in water. *Jour. Amer. Wat. Works Ass., 44,* 208-216.

NAUMANN, F. 1931: Limnologische Terminologie. In: *Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden,* Abt. IX, Teil. 8, 1-775.

RICKER, W. E. 1937: Statistical treatment of sampling processes usefull in the enumeration of plankton organisms. *Arch. Hydrobiol. (Plankt.), 31,* 68-84.

ROBERT, H. 1922: L'emploi du filet et de la pompe dans les pêches de plankton. *Ann. Biol. Lacustre, 11,* 208-240.

SCHMITZ, W. 1953: Die Genauigkeit quantitativer Planktonuntersuchungen mit dem Membranfiltrationsverfahren. *Ber. Limnol. Flussstat. Freudenthal, 5,* 77-86.

SERFLING, R. E. 1949: Quantitative estimation of plankton from small samples of Sedgewick-Rafter-Cell mounts of concentrate samples. *Trans. Amer. Micr. Soc., 68,* 185-199.

STANDARD METHODS for the examination of Water, Sewage and Industrial Wastes, 1955. *Amer. Publ. Health Ass. N.Y.,* 10th ed.

UEHLINGER, V. et LINDER, A. 1955: L'efficacité du dénombrement dans l'hémacytomètre. *Arch. Sciences, Genève, 8,* 429-441.

UTERMOEHL, H. 1927: Unzulänglichkeiten bei den bisherigen Einteilungen des mikroskopischen Gesichtsfeldes und ihre Beseitigung durch das Zählstreifenokular. *Z. wiss. Mikr., 44,* 466-470.

—— 1958: Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol., Mitt., 9,* 1-39.

VOLLENWEIDER, R. und WOLFF, H. 1948: Zur Methodik der Planktonstatistik. *Schweiz. Zeitschr. Hydrobiol., 11,* 254-262.

ANNEXE I

GLOSSAIRE DES NOTIONS STATISTIQUES UTILISÉES

L'application des critères statistiques contenus dans ce glossaire est présentée dans de nombreux traités de statistique biologique, tels que LINDER (1960), LAMOTTE (1957), auxquels nous renvoyons pour les méthodes de calcul.

1. MOYENNE

Moyenne arithmétique: $\bar{x} = Sx_i/n$,

où S = Somme
x_i = valeurs dénombrées
n = nombre d'échantillons ou d'unités examinés.

2. INDICES DE DISPERSION

Il existe différents critères pour caractériser la dispersion des mesures autour de la moyenne. En présentant une valeur de dispersion il est donc indispensable d'indiquer le critère adopté.

Variance

Moyenne des carrés des écarts à la moyenne:

$$s^2 = S(x_i - \bar{x})^2/(n-1) \ .$$

Ecart-type

Ecart quadratique moyen, aussi appelé déviation standard:

$$s = \sqrt{s^2} \ .$$

(« L'écart-moyen » est défini par la moyenne arithmétique des valeurs absolues des écarts des mesures à la moyenne: $e_m = S(x_i - x)/n$. Sa signification statistique théorique est compliquée, et l'emploi de ce critère est à déconseiller).

Intervalles de confiance

a) de l'échantillon: 68 % des mesures x_i sont compris dans l'intervalle

$$\bar{x} \pm s \ .$$

95 % des mesures x_i sont compris dans l'intervalle

$$\bar{x} \pm 1{,}96\, s$$

ou, grosso modo, $\bar{x} \pm 2\, s$.

b) de la moyenne: avec un coefficient de sécurité de 95 % la moyenne de l'ensemble de base est comprise dans l'intervalle

$$\bar{x} \pm 1{,}96\, s_{\bar{x}},$$

$$\text{ou } \bar{x} \pm 1{,}96\, s/\sqrt{n} \ .$$

Coefficients de variation

a) de l'échantillon: rapport de l'écart-type à la moyenne, exprimé en pourcents de la moyenne

$$CV = (s/\bar{x}) \ . \ 100\,\% \ .$$

b) de la moyenne: rapport de l'erreur standard de la moyenne, à la moyenne, exprimé en pourcents

$$CV_{\bar{x}} = (s_{\bar{x}}/\bar{x}) \ . \ 100\,\% \ ,$$

$$\text{ou } CV_{\bar{x}} = (s/\bar{x}\sqrt{n}) \ . \ 100\,\% \ .$$

Remarque: Dans le cas d'une distribution de Poisson, la variance est proportionnelle à la moyenne, et le coefficient de variation est inversement proportionnel à la racine carrée de cette moyenne.

Exemple:

avec une densité de $\bar{x} = 10$ organismes par unité de dénombrement, le CV estimé selon Poisson est égal à

$$CV = (\sqrt{10}/10) \,.\, 100\% = 31{,}5\%\,, \text{ et}$$

avec une densité de $\bar{x} = 100$ organismes par unité de dénombrement,

$$CV = (\sqrt{100}/100) \,.\, 100\% = 10\%\,;$$

c'est-à-dire une même méthode de dénombrement donne un coefficient de variation de 10% ou de 31% selon la densité des organismes à compter, indépendamment de sa précision propre. Un coefficient de variation ne prend donc une signification valable qu'au moment où la moyenne correspondante est indiquée. En outre, on ne peut comparer que les coefficients de variation qui se basent sur des moyennes équivalentes.

3. Analyse de variance

Cette méthode permet d'une part de tester l'homogénéité d'une série de chambres à dénombrer, et d'autre part d'estimer la variance due aux techniques de préparation de cette série, ainsi que la variance existant à l'intérieur de chaque chambre. Ces deux variances se comparent au moyen du critère de F.

4. Critère de F

Comparaison de deux variances s_1^2 et s_2^2:

$$F = s_1^2/s_2^2\,.$$

5. Critère de Student « t »

Comparaison de deux moyennes $\bar{x}_1$ et $\bar{x}_2$:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)/s_d\,,$$

s_d étant l'erreur standard de la différence des moyennes.

6. Distribution de Poisson

Les organismes qui se déposent sans influence perturbatrice extérieure, sur le fond d'une chambre à dénombrer, présentent dans le sédiment une distribution qui est caractérisée par la fonction de Poisson:

$$P(x) = e^{-m}\, m^x x\,!\,,$$

où $P(x)$ = probabilité de trouver un nombre x d'individus dans une unité de surface, et
m = densité moyenne des organismes dans toute la chambre.

7. Critère du Chi-carré

Test de conformité

Comparaison d'une distribution expérimentale (fréquences f_{exp}) avec une distribution théorique (fréquences f_{th}):

$$\chi^2_{conformité} = S\,[(f_{exp} - f_{th})^2/f_{th}].$$

Test de variance

Comparaison, dans une distribution de Poisson, de la variance avec la moyenne (ce deuxième critère est plus sévère que le premier):

$$\chi^2_{variance} = S\,(x_i - \bar{x})^2/\bar{x}\,.$$

Tableau de contingences 2 × 2

Les fréquences des catégories de caractères sont disposées en un tableau à double entrée, selon les alternatives de deux différents caractères. L'indépendance des deux caractères est testée dans ce tableau par le critère de Chi-carré:

$$\chi^2_{contingences} = n\,(a_1\,b_2 - a_2\,b_1)^2 \,/\, (a_1 + b_1)\,(a_2 + b_2)\,(a_1 + a_2)\,(b_1 + b_2)\ ,$$

avec $a_1 + a_2 + b_1 + b_2 = n$ représentant les fréquences dans la 1re et la 2e classe des caractères a et b.

8. Conditions optimum du dénombrement

(voir le développement des formules au §VI.1)

Nombre minimum de carrés à dénombrer

$$N_{c,\,min} = \sqrt{(K_p/K_c)(s_c^2/s_p^2)}\ .$$

Nombre minimum de chambres à préparer

$$N_{p,\,min} = K/(K_p + K_c\,N_{c,\,min})\ .$$

Annexe II

DEUX SYSTÈMES DE POINTS RÉPARTIS AU HASARD SUR UNE SURFACE CIRCULAIRE DE 25 UNITÉS DE DIAMÈTRE

(cf. §VII.2)

Système A

Point n°	Ligne n°	Colonne n°	Point n°	Ligne n°	Colonne n°
1	16	22	26	22	13
2	18	18	27	22	17
3	16	8	28	2	17
4	6	9	29	10	8
5	14	6	30	13	13
6	5	4			
7	19	15	31	7	10
8	11	5	32	22	6
9	6	18	33	11	20
10	21	14	34	20	22
			35	22	7
11	13	8	36	16	6
12	7	3	37	8	13
13	8	2	38	8	18
14	11	4	39	24	16
15	16	4	40	23	20
16	7	8			
17	9	15	41	23	6
18	18	17	42	14	23
19	1	10	43	9	18
20	19	11	44	9	23
			45	4	14
21	20	3	46	9	24
22	13	5	47	17	16
23	8	23	48	11	16
24	25	12	49	7	12
25	18	16	50	6	6

Point n°	Ligne n°	Colonne n°	Point n°	Ligne n°	Colonne n°
51	5	6	76	2	18
52	16	1	77	11	14
53	8	12	78	17	14
54	3	10	79	10	7
55	9	4	80	10	19
56	12	8			
57	9	11	81	1	11
58	17	18	82	10	23
59	15	19	83	20	14
60	24	10	84	11	17
			85	11	8
61	9	12	86	18	15
62	11	15	87	18	4
63	22	14	88	21	15
64	19	17	89	6	10
65	10	10	90	18	9
66	21	5			
67	21	12	91	14	11
68	18	7	92	10	13
69	8	15	93	15	18
70	22	5	94	19	18
			95	14	12
71	16	7	96	15	20
72	9	19	97	12	13
73	6	15	98	6	8
74	12	25	99	1	12
75	12	10	100	6	16

Système B

1	16	16	23	9	3
2	10	16	24	19	6
3	8	18	25	5	22
4	11	5	26	13	18
5	8	5	27	17	12
6	12	21	28	15	4
7	22	19	29	10	16
8	18	16	30	3	6
9	12	3			
10	14	11	31	8	11
			32	2	18
11	9	13	33	10	14
12	19	21	34	21	19
13	9	11	35	12	22
14	3	8	36	14	10
15	7	3	37	12	6
16	2	14	38	18	24
17	22	5	39	21	17
18	12	22	40	22	21
19	23	15			
20	13	14	41	16	24
			42	22	15
21	4	14	43	10	8
22	17	18	44	17	10

Point n°	Ligne n°	Colonne n°	Point n°	Ligne n°	Colonne n°
45	17	17	73	10	25
46	16	16	74	24	13
47	7	23	75	7	10
48	24	7	76	5	14
49	4	5	77	7	17
50	4	19	78	12	15
51	23	6	79	17	24
52	16	10	80	17	8
53	15	20			
54	12	23	81	18	8
55	19	9	82	8	9
56	15	18	83	16	25
57	24	12	84	16	23
58	9	11	85	18	7
59	8	18	86	22	14
60	17	21	87	19	13
			88	20	12
61	8	4	89	24	19
62	12	2	90	5	19
63	16	9			
64	9	24	91	3	9
65	17	14	92	2	18
66	10	24	93	11	11
67	7	16	94	13	24
68	16	19	95	5	12
69	16	3	96	22	21
70	18	13	97	19	18
			98	6	19
71	15	13	99	3	13
72	6	8	100	19	18

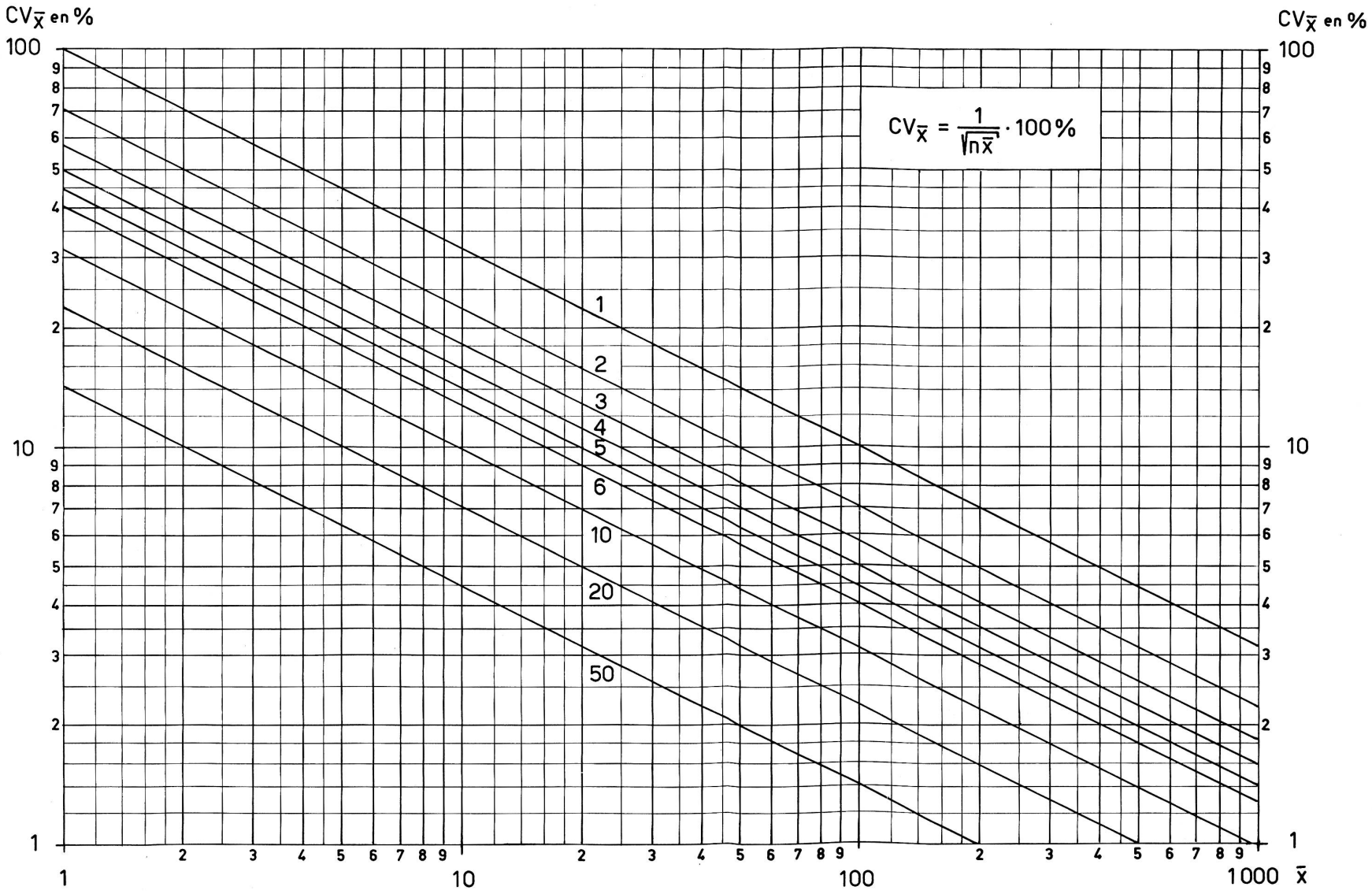


Planche I *a*

Répartition de Poisson: Coefficient de variation de la moyenne $CV_{\bar{x}}$ en fonction de la moyenne $\bar{x}$, pour 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 répétitions n.

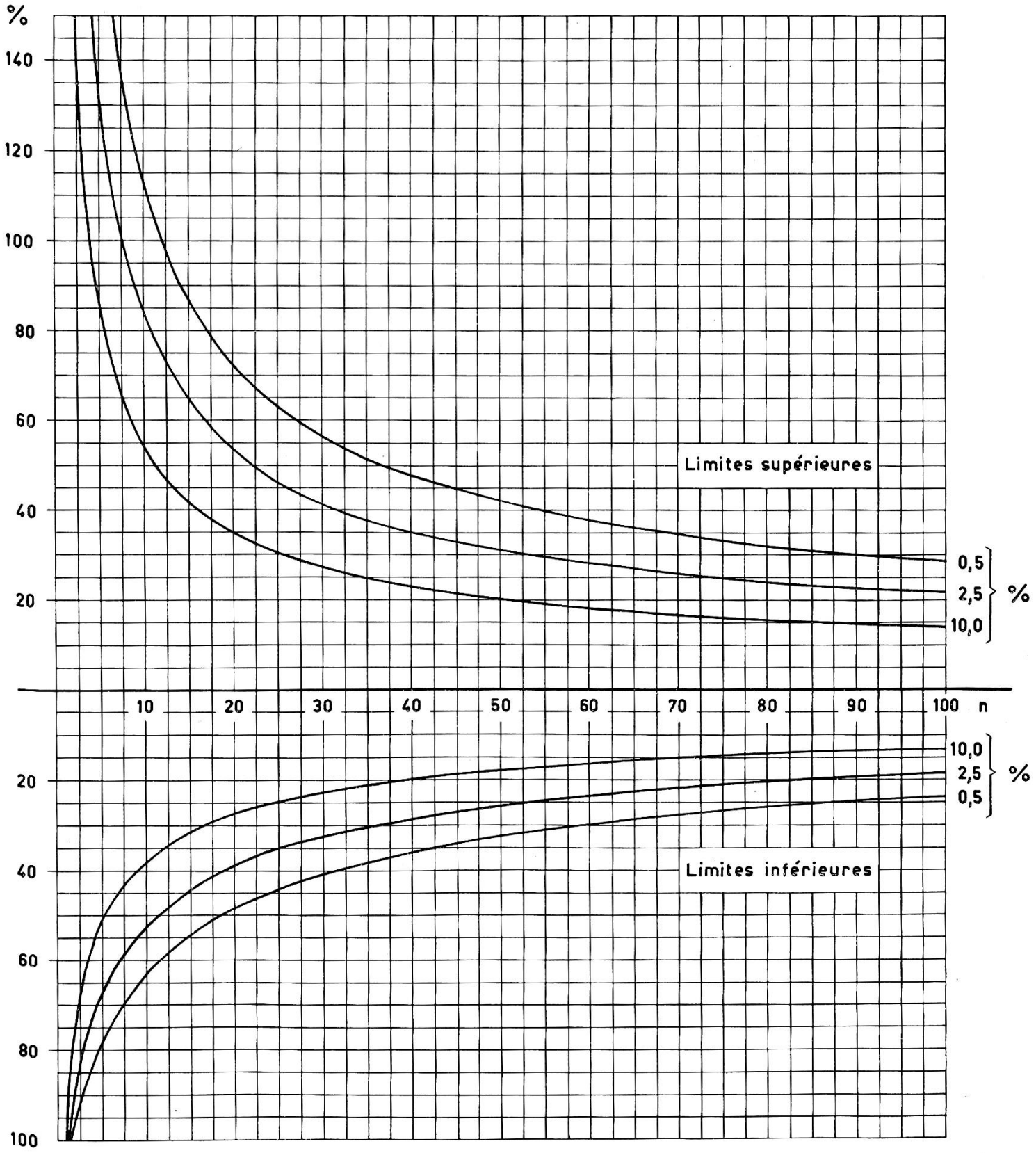


Planche I *b*

Répartition de Poisson: Limites supérieures et inférieures de l'intervalle de sécurité (les limites sont exprimées en pour-cent du nombre N d'unités dénombrées).
Limites de 10%: intervalle = 80%
Limites de 2,5%: intervalle = 95%
Limites de 0,5%: intervalle = 99%.

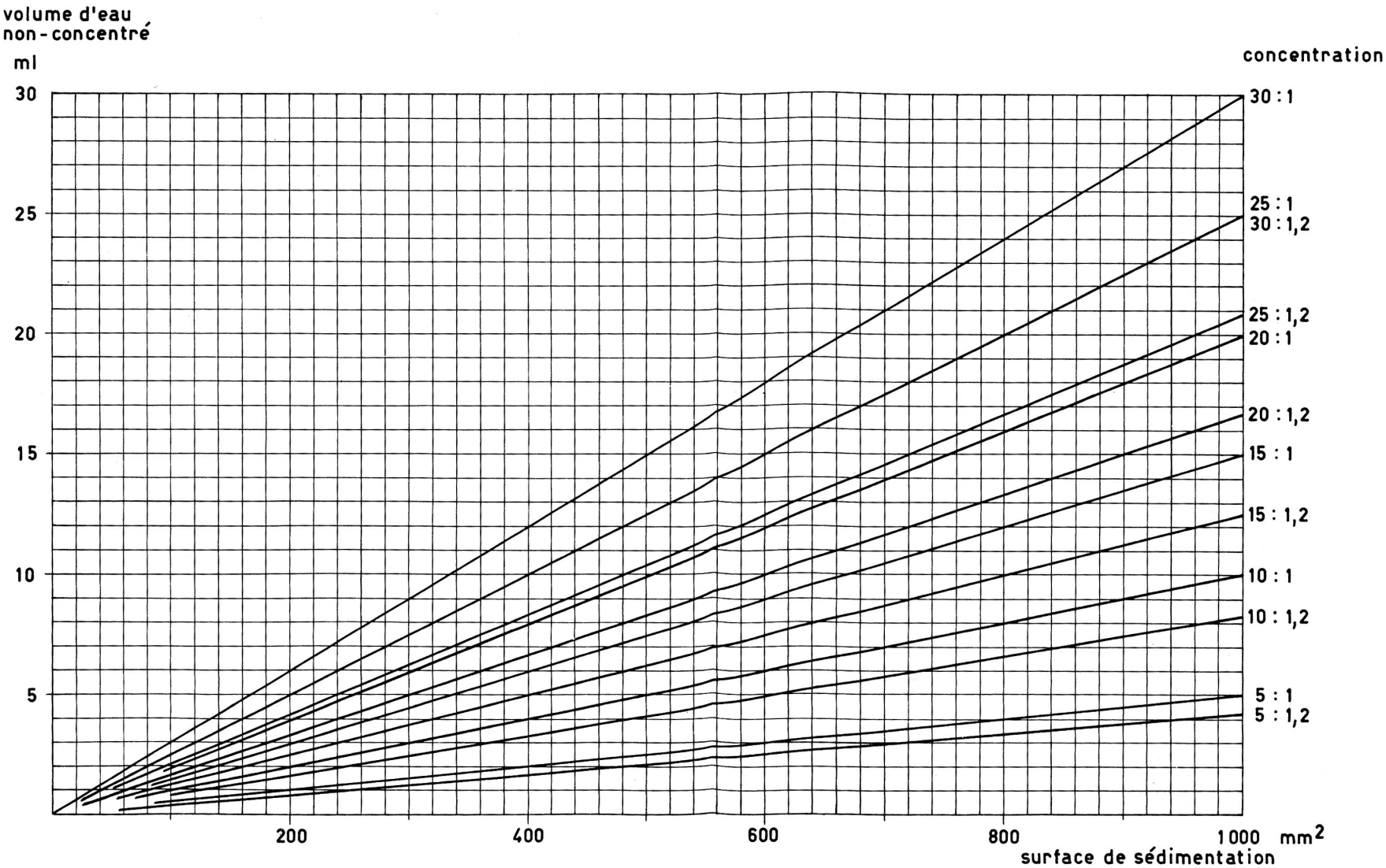


Planche II *a*

Volume initial d'eau correspondant à la surface de sédimentation (1000 mm²) de la chambre Sedgewick-Rafter (1 ml).

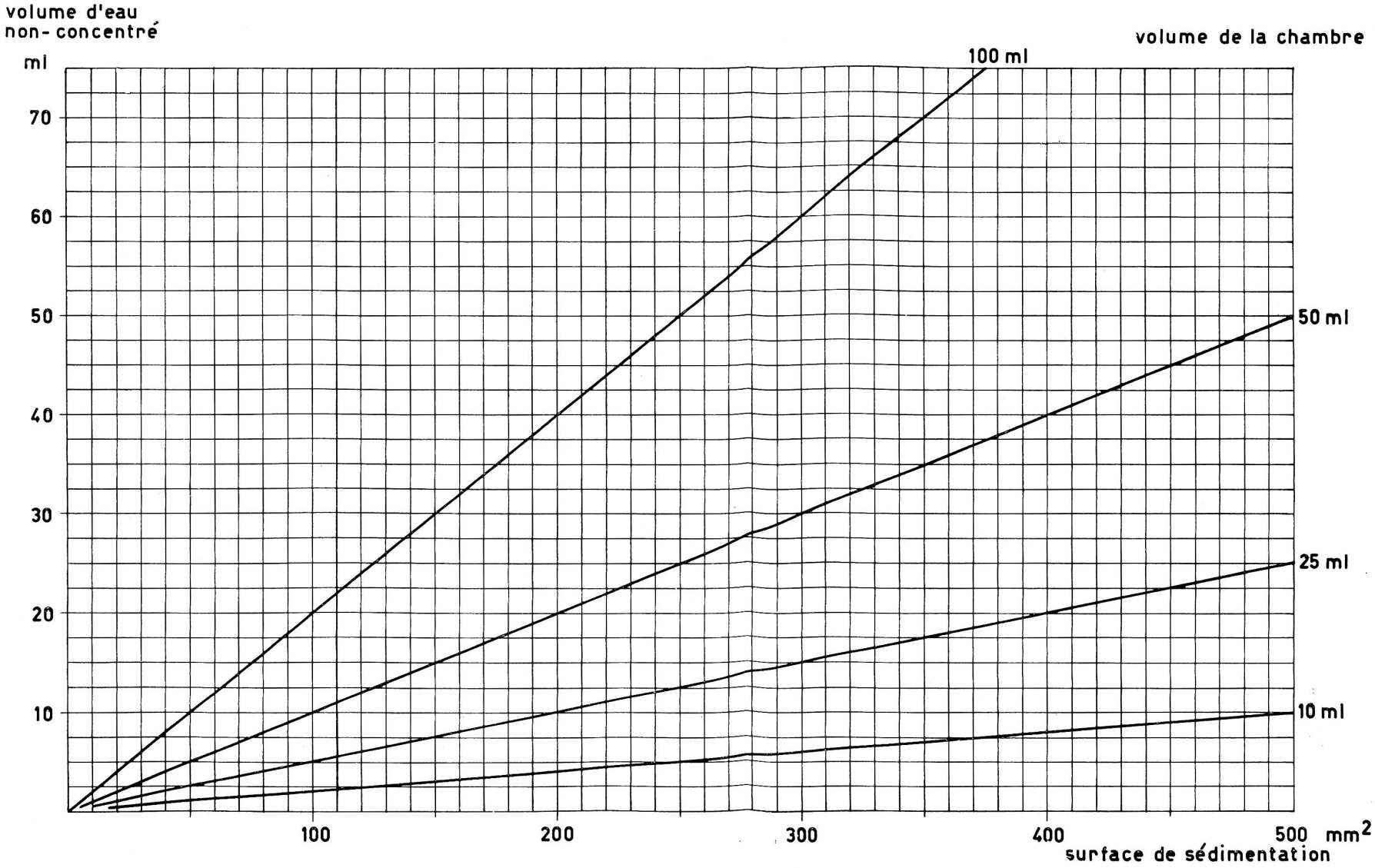


Planche II *b*

Volume initial d'eau correspondant à la surface de sédimentation (500 mm²) de la chambre tubulaire et la chambre combinée Utermoehl.

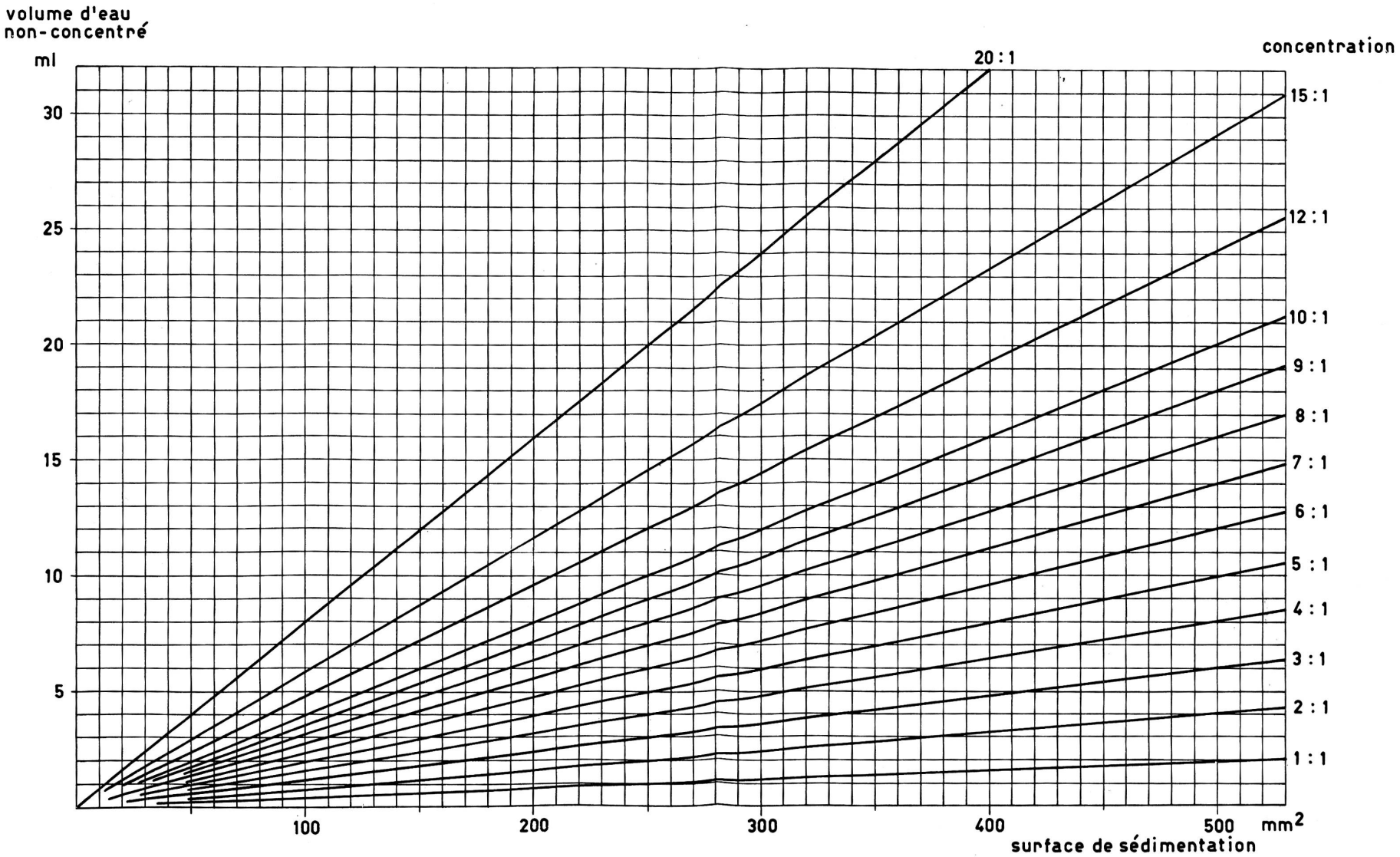


Planche II *c*

Volume initial d'eau correspondant à la surface de sédimentation de la chambre à plaques (2,125 ml; 527 mm²), concentré par centrifugation ou par décantation

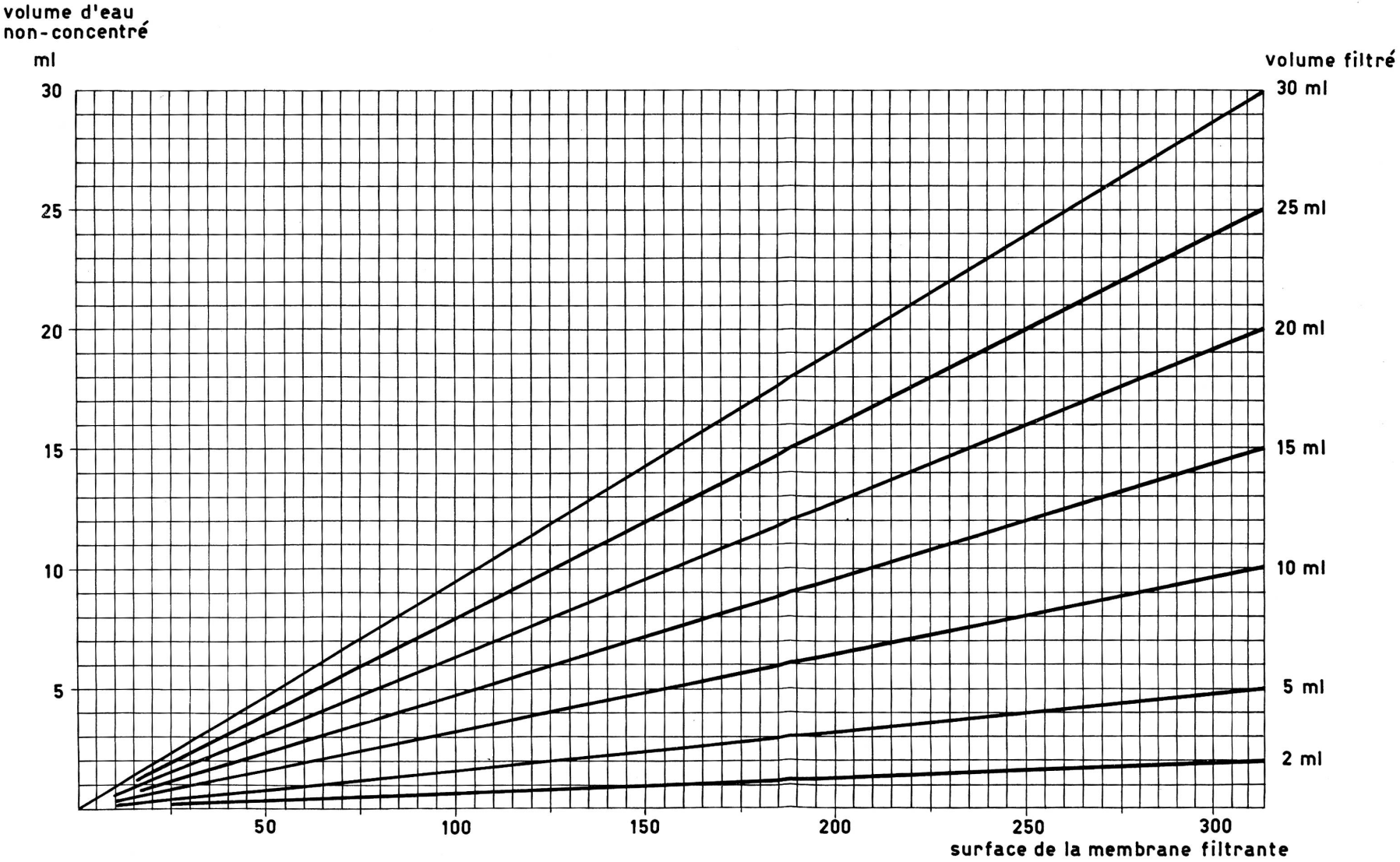


Planche II *d*

Volume initial d'eau correspondant à la surface de la membrane filtrante (⌀ 20,5 mm), membrane séchée après ultrafiltration.

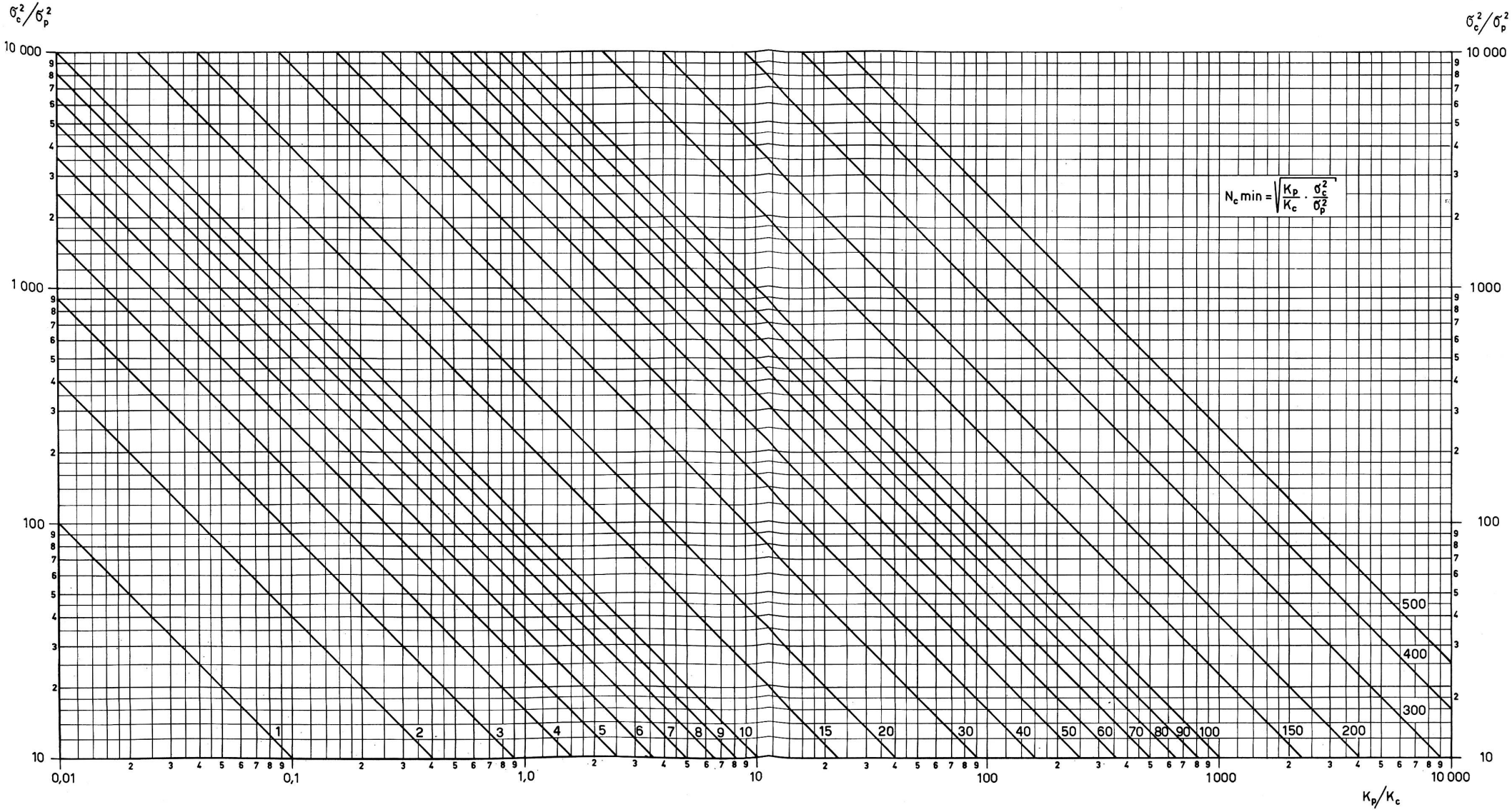


Planche III

Valeurs de $N_{c,\,min}$ en fonction de K_p/K_c et σ_c^2/σ_p^2 .