

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
Kapitel: V: Concentration et chambres à dénombrer
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-739883>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. 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. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

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. [Voir Informations légales.](#)

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. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 01.04.2025

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

Entre les différentes profondeurs nous ne constatons aucune inégalité significative dans les espèces *Ceratium*, *Asterionella*, *Fragilaria*, *Melosira*, *Tabellaria* et *Gemelliscystis*, 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 « Zûrcher 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 (UTERMÖEHL 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 décan-tation 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 50μ au minimum retient quantitativement le mésoplancton ($> 50 \mu$ 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 échan-tillons 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 sta-tistique de leurs dénombrements des 10 échantillons donne des $\chi^2 > \chi_{0.05}^2$ 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

$$s_{\bar{x}}^2 \cong \frac{\bar{x}}{n}$$

dont on obtient:

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

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

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

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

Prélèvement	<i>Nauplius</i>	<i>Diaptomus</i>	<i>Daphnia</i>	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^2 variance	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:				
$\frac{\sigma_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\% = CV_{\bar{x}}$	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)

	<i>Diaptomus</i>	<i>Daphnia I</i>	<i>Daphnia II</i>
Moyenne \bar{x} de dix prélèvements . . .	19,7/litre	11,9/litre	4,10/litre
χ^2 variance	20,1	10,6	8,51
$p(\chi^2)$	$\approx 0,01$	$> 0,05$	$> 0,05$
$CV_{\bar{x}}$	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°	<i>Ceratium</i>	<i>Fragilaria</i>	<i>Dinobryon</i>	<i>Tabellaria</i>
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 }	113,4 }
Reste } Echantillons	24 }	5924,7 }	246,9 }
		6604,8	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 :

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

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	$\chi^2_{\text{var.}}$	$\chi^2_{0,05}$	\bar{x}	$CV_{\bar{x}}$	($CV_{\bar{x}}$ pour 10 mm ²)
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 Ia, 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

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

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:

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

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 <i>Ceratium</i>	44	44	41	28	43	48	39	51

$$\bar{x} = 42,25 \text{ Ceratium/10 ml}$$

$$s^2 = 47,357$$

$$s_{\bar{x}} = 2,43$$

$$CV_{\bar{x}} = 5,75\% \text{ (pour huit répétitions)}$$

En comparant ce résultat de $CV_{\bar{x}}$ avec les valeurs théoriques de la planche Ia, 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:								
<i>Fragilaria</i> (colonies) . .	557	463	372	401	424	357	429,0	6,97%
<i>Asterionella</i> (colonies) . .	173	176	200	147	182	154	172,0	4,57%
<i>Melosira</i> (filaments) . .	5	9	5	5	5	5	5,7	12,7%
<i>Tabellaria</i> (colonies) . .	5	2	3	3	8	4	4,2	20,9%
<i>Dinobryon</i> (colonies) . .	14	25	12	11	17	13	15,3	13,8%
<i>Eudorina</i> (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 Ia 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 LITTLE-FORD 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 } $F = 2,68$ 5.866,9
Chambres	24	140.806,9	
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 Ia).

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 Ia, 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	1,96s	2CV
<i>Ceratium</i>	10,44	3,23	7,06	45,7 %	6,33	90,4 %
<i>Codonella</i> *	96,91	(9,84)	(46,7)			
<i>Asterionella</i>	148,7	12,19	85,4	14,3 %	23,89	28,6 %
<i>Fragilaria</i>	42,88	6,55	29,8	22,0 %	12,84	44,0 %
<i>Melosira</i>	40,19	6,34	16,5	39,4 %	12,43	76,8 %
<i>Tabellaria</i>	1,281	1,13	1,41	80,1 %	2,21	160,2 %
<i>Gemellcystis</i>	9,03	3,01	5,91	50,9 %	5,90	101,8 %
<i>Daphnia</i> *	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>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Dénombrement <i>A</i>	4) <i>MR</i>	—	—	—
<i>B</i>	5) <i>MR</i>	6), 9) <i>MR</i>	7), 9) <i>MR</i>	—
<i>C</i>	5) <i>MN</i>	6), 9) <i>MN</i>	7), 9) <i>MN</i>	—
<i>D</i>	5), 10) <i>MN</i>	6), 10) <i>MN</i>	7), 10) <i>MN</i>	—
<i>E</i>	—	—	—	11) <i>MN</i>

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>I</i> Utermoehl	<i>II</i> Cylindre gradué	<i>III</i> Centrifugation	<i>IV</i> à membrane
<i>A</i> Chambre tubulaire, Microscope renversé	46,14 46,88 45,43 47,36 $\bar{x} = 46,45$ $s = 0,826$ $CV = 1,8\%$	—	—	—
<i>B</i> 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 $\bar{x} = 45,73$ $s = 7,59$ $CV = 16,6\%$	—
<i>C</i> 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 $\bar{x} = 66,31$ $s = 18,27$ $CV = 27,6\%$	—
<i>D</i> 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 $\bar{x} = 49,30$ $s = 7,28$ $CV = 14,8\%$	—
<i>E</i> 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 }	31	1902,56	63,17
Reste }			

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.)	$\bar{x} = 45,18$	<i>Synedra</i> /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 $s = CM \text{ reste} = \sqrt{63,12} = 7,95$.

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	<i>t</i>	$t_{0,05}$	<i>DL</i>	Différence
<i>A I</i> et <i>B I</i>	2,27	2,45	6	non-significative
<i>B I</i> et <i>E IV</i>	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.