

UTILISATION DE L'ATP (ADENOSINE TRIPHOSPHATE)
COMME ESTIMATEUR DE LA BIOMASSE DU SESTON
EN EAU SAUMATRE TROPICALE

par

Lionel LEMASSON¹ et Jean PAGES¹

Centre de Recherches Océanographiques
B.P. V 18 ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

R E S U M E

L'utilisation de l'ATP comme indicateur de biomasse se heurte à des difficultés en lagune Ebrié, où les rapports de conversion C/ATP généralement utilisés ne sont pas applicables. Après une étude de la variabilité des mesures et une discussion des causes d'erreurs, une méthode est proposée pour déterminer les rapports réels, utilisant des cultures de populations naturelles faites in situ dans des sacs à dialyse. En zone d'estuaire urbaine, on trouve ainsi : C/ATP = 350.

A B S T R A C T

The determination of ATP concentrations as a measure of sestonic biomass in a tropical lagoon (Ebrié, Ivory Coast) has demonstrated certain difficulties inherent in the use of this technique. C/ATP ratios generally quoted for the estimation of biomass are inappropriate in this particular case. Subsequent to a study of the variability in measured concentrations and an analysis of the causes of error a method is proposed for the establishment of a C/ATP ratio applicable to this system. This has been accomplished by measurements on natural populations allowed to grow in dialysis bags placed "in situ" in lagoon waters. The C/ATP ratio pertinent to the urbanised estuarine zone of the lagoon has been found to be 350.

¹ Adresse présente : Antenne ORSTOM, Station INRA, Avenue de Corzent, 74203 - THONON-LES-BAINS (France).

INTRODUCTION

Un des problèmes les plus délicats dans les études de production primaire est l'évaluation de la biomasse microbienne sensu stricto du seston, c'est à dire de la partie vivante constituée par le phytoplancton et les bactéries. Les différents moyens d'aboutir à une évaluation pour la lagune Ebrié ont été étudiés par Lemasson *et al.* (1981).

Parmi les paramètres les plus couramment utilisés pour estimer la biomasse, l'ATP (adénosine triphosphate) est particulièrement intéressant car il est le constituant de tous les organismes vivants ; en outre il disparaît à la mort des cellules. Donc, si l'on connaît le rapport de conversion de l'ATP en carbone vivant (il est en effet d'usage de ramener au carbone les évaluations de biomasse) on pourra avoir en principe une bonne évaluation de celle-ci.

Mais deux critiques essentielles peuvent être faites :

1° - il peut y avoir passage d'ATP dans la solution au moment de la filtration, d'où sous-estimation de la biomasse.

2° - l'extraction devient inefficace lorsque la concentration en ATP est importante ou que les volumes filtrés sont trop grands. En outre l'ATP ne permet pas de différencier les biomasses bactériennes et phytoplanctoniques.

i. METHODE

La mesure de l'ATP intracellulaire dans les organismes marins a été mise au point et décrite par Holm-Hansen et Booth (1966) ; c'est cette méthode qui a été adaptée et utilisée pour les études en lagune.

1.1. FILTRATION

Les échantillons sont tamisés sur une soie de 200 μ m de vide de maille pour éliminer les gros organismes zooplanctoniques, puis filtrés sur

filtre de fibre de verre Gelman A-E, ou Whatman GF/A de porosité 0,3 à 0,5 μm et 47 mm de diamètre. Le volume filtré (50 à 500 ml d'eau) est déterminé pour que le temps de filtration n'excède pas 5 minutes et pour éviter un colmatage du filtre, sous une dépression de 100 à 150 torr. La fin de la filtration doit être surveillée pour que le filtre ne soit jamais mis à sec.

1.2. EXTRACTION

On utilisera du tampon TRIS (0,02 N ; pH = 7,75) préalablement stérilisé à l'autoclave, et un dispositif permettant d'en délivrer rapidement un volume donné (seringues Cornwall ou Manostat, par exemple). D'autres procédés d'extraction ont été décrits, utilisant NaOH (Frischknecht et Schneider, 1979), l'EDTA (Karl et LaRock, 1975), et, pour les sédiments, SO_4H_2 (Karl *et al.*, 1978).

La filtration étant terminée, le filtre est ensuite le plus rapidement possible placé dans un tube à essai dans lequel on verse immédiatement du Tris bouillant (7 ml) ; le tube est aussitôt remis dans une bouilloire pendant au moins 5 minutes pour extraction de l'ATP, puis l'extrait est transvasé dans un autre tube à essai, après essorage du filtre avec un agitateur de verre ; le tube, fermé avec du Parafilm, est conservé au congélateur à -20°C .

1.3. MESURE AU LABORATOIRE

La mesure de l'ATP se fait en utilisant la réaction lumineuse de la luciférine-luciférase avec l'ATP.

a) ~ Préparation de la luciférine-luciférase :

Les extraits purifiés d'abdomen de lucioles (Sigma Chemical Co) stockés à -20°C sont réhydratés avec du Tris (15 ml) et autoclavés. Ils sont ensuite centrifugés (5 minutes à 1000 g) et gardés dans la glace ; des essais ont été faits en filtrant les extraits au lieu de les centrifuger mais aucune différence significative n'a été observée entre les deux méthodes. La solution, conservée à 0°C , n'est pas stable et une recalibration avec des étalons devra être faite toutes les heures.

b) - Etalonnage :

L'étalonnage est effectué avec de l'ATP sous forme de sel sodique. On obtient une relation linéaire (en log-log) entre les concentrations de 2.10^{-3} et 5.10^{-2} $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ATP. En dessous de 2.10^{-3} $\mu\text{g.ml}^{-1}$ le bruit de fond devient trop important et au-dessus de 5.10^{-2} $\mu\text{g.ml}^{-1}$ il y a une émission lumineuse excessive et saturation du compteur ; dans ce dernier cas il est nécessaire de diluer.

Réalisation pratique :

1 mg d'ATP dissous dans 50 ml de Tris est réparti par 1 ml dans des tubes Pyrex bouchés au Parafilm, et conservés au congélateur. Par la suite on utilisera un tube chaque fois que l'on désirera réaliser une gamme de dilutions dans le Tris. La durée de conservation des tubes de solution-mère est au moins de 6 mois.

c) - Mesure :

L'émission lumineuse a été mesurée au compteur à scintillation liquide (Intertechnique SL 30) dans des fioles à scintillation ; 200 μl d'enzyme sont ajoutés à 200 μl d'extrait. Le début de la lecture se fait après un temps, déterminé avec précision au chronomètre, de 8 secondes après l'addition de la solution Tris-enzyme. La lecture se fait sur le canal ^{14}C , pendant une durée de 1 minute. La correction de coïncidence sera supprimée.

Remarques :

1° - La géométrie de la fiole de comptage a une grande importance et on peut accroître le rendement en utilisant des fioles plus étroites (fioles Wheaton à fond conique ; tubes à hémolyse).

2° - Le volume de l'extrait sera mesuré avec précision, ou ajusté à un volume donné constant avec de l'eau distillée avant la série de mesures.

3° - Toutes les extractions doivent être faites au moins en double, les sous-échantillons provenant du même prélèvement.

2. DISCUSSION

2.1. VARIABILITE INTRODUITE PAR LES DIFFERENTES ETAPES DE LA MESURE ELLE-MEME

Elle a été évaluée par deux séries de mesure (Pagès *et al.*, 1981b) permettant d'isoler les sources de variabilité :

1° - Des dosages répétés sur un même extrait donnent l'erreur sur la détermination de la concentration dans une prise d'essai, comprenant :

- les erreurs de volume sur l'extrait (200 μ l) et la luciférine-luciférase (200 μ l).

- les erreurs de "temps initial" (le comptage commence 8 secondes après l'injection des 200 μ l de luciférine-luciférase).

- les erreurs de comptage, qui sont faibles puisque le temps de comptage est déterminé automatiquement par le compteur à scintillation (erreur inférieure à 1%).

Pour $n = 14$ on a $C_V = 23,4\%$ (C_V : coefficient de variation). On constate que l'essentiel de la variabilité provient de la détermination, le C_V total étant de 30% ; le reste de la variabilité peut provenir de l'extraction, de l'échantillonnage et de la microdistribution.

2° - Deux séries de trois extractions faites à cinq stations différentes, effectuées simultanément par deux expérimentateurs sur le même échantillon mais sur des sous-échantillons différents, montrent (Tab.1) des différences significatives entre expérimentateurs à chacune des stations.

L'influence possible des caractéristiques du milieu, plus ou moins eutrophe selon la situation géographique des stations, peut être évaluée en comparant les résultats obtenus en lagune à des résultats antérieurs obtenus en haute mer (Herbland et Pagès, 1975) qui ont été repris et reportés, après un traitement analogue, sur la figure 1 ; cet ensemble de mesures (ATP-Guinée) montre une distribution analogue des C_V , alors que les concentrations en ATP dans le Dôme de Guinée sont de 10 à 100 fois plus faibles.

		Moyennes observées ATP ($\mu\text{g l}^{-1}$)				
A	Station	1	2	3	4	5
	Expérimentateur A	1110	705	2967	1505	1163
	Expérimentateur B	2102	630	3853	2791	1437

B	Source d variation	Carrés moyens	d.l.	F
	Facteur a	3 393 607	1	13,5*
	Facteur b	6 419 797	4	25,6***
	Interaction ab ..	465 839	4	1,8***
	Variation rési- duelle	250 759	20	
	Total		29	

Tableau 1 - A : Différences entre expérimentateurs.
B : Analyse de variances.

Facteur a : différence entre expérimentateurs.
Facteur b : la différence entre expérimentateurs (facteur a) n'est significative qu'au niveau 97,5%.

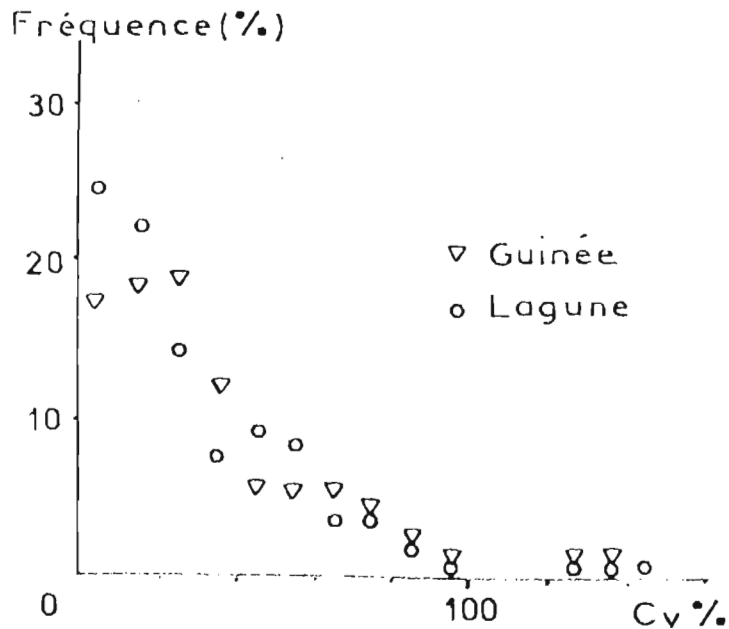


Figure 1 - Distribution des fréquences des C_v pour l'ATP en lagune Ebrié (○) et en haute mer (golfe de Guinée) (▽).

2.2. VARIABILITE DUE A LA METHODE

Pour l'évaluer on dispose de 160 séries de 2 sous-échantillons. La transformation log normalise la population, homogénise les variances et rend moyennes et variances indépendantes (Frontier, 1972, 1973 ; Pagès *et al.*, 1981b). On calcule la variance intra-classe sur ces données transformées : $s_{intra}^2 = 0,0714$. Le coefficient de variation C_v peut aisément être calculé dans cette transformation où il reste constant : $C_v = 30\%$ (limites de confiance à 95% : 29,9 et 31,9). Les intervalles de confiance à différentes concentrations sont donnés dans le tableau 2.

ATP	Intervalles de Confiances	
	-2 S	+2 S
0.2	0.12	0.34
0.5	0.29	0.85
1.0	0.59	1.71
1.5	0.88	2.56
2.0	1.17	3.41
5.0	2.93	8.53

Tableau 2 - Intervalles de confiance à 95% de l'ATP ($\mu\text{g.l}^{-1}$).

Des considérations sur le type de la transformation log, exposées dans Pagès *et al.* (1981b) montrent qu'il y a une surdispersion que l'on peut attribuer soit au fait que l'ATP mesure, outre la biomasse phytoplanctonique, également la biomasse bactérienne, soit à un artefact. En effet les détritiques étant surdispersés et des colonies bactériennes se trouvant fréquemment autour des détritiques, il se peut que l'ATP soit surdispersé. Mais il se peut aussi que les causes d'erreur, nombreuses pour l'ATP, biaisent la distribution, en particulier les différences observées entre deux expérimentateurs. Nous avons vu que l'essentiel de la variabilité provenait de la détermination elle-même, faite au laboratoire, et en particulier de la forte variabilité des dosages faits sur un même extrait (Lemasson *et al.*, 1981) ; des mesures analogues sur des échantillons de haute mer (Herbland et Pagès, données non publiées) fournissent les chiffres suivants :

$n = 21$ $C_v = 32,9\%$ (lim. conf. à 95% : 21,8 à 59,4)

$k = 9$ (nombre de séries)

Ces chiffres sont comparables à ceux obtenus en lagune. Mais dans la détermination les erreurs au niveau des volumes de réactifs et du comptage sont relativement faibles, des comptages d'étalons radioactifs d'un volume de 200 μ l (Pagès et Lemasson, données non publiées) ayant fourni les chiffres suivants :

$n = 28$ $C_v = 3,3\%$ (lim. conf. à 95% : 2,3 à 5,1%)

$k = 13$

Il semble donc qu'il y ait une erreur spécifique de la mesure de l'ATP, provenant soit de la géométrie variable des réactifs dans la fiole à scintillation, soit de l'hétérogénéité de l'extrait, soit de celle de la luciférine-luciférase malgré une centrifugation (remplacée ultérieurement par une filtration) ; il est probable que tous ces facteurs jouent simultanément pour rendre la mesure peu précise.

La décomposition des variances sur l'ATP montre que l'erreur méthodologique masque complètement la microdistribution, et la distribution des mesures d'ATP devrait donc être faite au hasard ; la surdispersion observée est donc artificielle et est difficilement expliquable ; elle peut être due en particulier à la différence introduite par deux expérimentateurs différents, et la surdispersion par agrégats n'est pas détectable.

2.3. ERREURS METHODOLOGIQUES

Il existe plusieurs causes d'erreurs dans cette détermination de l'ATP (Perry *et al.*, 1979) ; la biomasse du volume filtré ne doit pas être importante pour éviter le colmatage du filtre et la destruction des cellules. La quantité d'ATP extrait dépendrait du volume filtré, les pertes avec des eaux côtières très riches en matière vivante pouvant atteindre de 10 à 50% (Sutcliffe *et al.*, 1976) ; le rendement de l'extraction est meilleur avec de faibles volumes. D'autre part la température du Tris d'extraction est très importante et ne doit absolument pas être inférieure à 95°C. A 90°C ou moins l'efficacité de l'extraction est très réduite ; or il y a abaissement de température lors de l'introduction du filtre dans le Tris. Perry *et al.* (1979) suggèrent de laisser le liquide d'extraction sur une plaque chauffante à 400°C

en utilisant un bécher, ce qui procure une surface de contact filtre-Tris plus importante et permet de réduire notablement l'abaissement de température.

L'ATP peut en outre ne pas être entièrement extrait ; Karl et LaPock (1975) signalent en effet que dans les eaux chargées en particules il se forme autour de la particule solide un film mince (0,025 à 0,25 mm d'épaisseur) qui n'a pas les mêmes caractéristiques que l'ensemble de la solution, et dans lequel se créent des gradients thermiques importants ; le transfert de chaleur se fait par convection dans la solution alors que dans cette couche limite il s'effectue par conductivité, et donc plus lentement (Knudson et Katz, 1954). Alors que la température de la solution est voisine de 100°C, elle est nettement inférieure au contact de la particule, et les bactéries adhérentes à celle-ci ne sont donc pas soumises à des températures suffisantes pour permettre l'extraction de l'ATP et empêcher son hydrolyse.

Un autre biais peut intervenir au niveau de la filtration, une partie de l'ATP passant dans le filtrat. En effet Rieman (1979) estime que l'ATP peut subsister à l'état dissous dans l'eau où il a été effectivement mesuré ; cet ATP dissous proviendrait de la lyse des cellules durant la filtration ("stress" dû au vide ou au filtre) et/ou des bactéries inférieures à 0,2 µm. Il pourrait représenter jusqu'à 76 à 90% de l'ATP total (Azam *et al.*, 1977) ; on sous-estimerait donc la quantité d'ATP particulière, ce qui aurait une influence sur le rapport de conversion ; la valeur (C_p vivant)/ATP = 250 généralement utilisée sera discutée par la suite.

D'autres causes d'erreur existent au niveau du comptage. Il existe en effet plusieurs types d'interférences qui peuvent troubler la mesure et qui pourraient être étudiées en utilisant la courbe totale d'émission lumineuse que l'on compare ensuite à des standards. Or ce n'est pas possible avec un compteur à scintillation liquide qui n'intègre qu'une partie de la courbe décroissante de la luminescence, et qui nécessite un délai avant le début du comptage. Par contre on peut utiliser des étalons internes pour pallier cette interférence.

Les causes d'erreur sont :

- présence de particules en grande quantité sur lesquelles l'ATP est adsorbé (Karl et LaRock, 1975).

- ATP fixé par l'extraction, mais restant dans les cellules, et jeté ensuite avec le filtre (Perry *et al.*, 1979) ou micro-organismes provenant d'une pollution extérieure.

- inhibition ionique qui dépend de la concentration des ions en présence, et de la quantité d'ATP.

- émission lumineuse accrue par suite de la présence de molécules fortement énergétiques telles que les nucléotides triphosphates autres que l'ATP (principalement le GTP (Karl *et al.*, 1978) qui peuvent être responsables de plus de 50% de la lumière émise.

- qualité des réactifs.

Wildish (1976) signale que la présence d'enzymes de transphosphorylation peut entraîner une variation de la durée d'émission lumineuse due à une transformation enzymatique de molécules à haute énergie.

2.4. VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES ET RAPPORT DE CONVERSION C/ATP

On considère que l'ATP représente en moyenne 0,35% du carbone cellulaire (Holm-Hansen, 1970) ce qui donne un rapport C/ATP de 250, valeur moyenne obtenue à partir de cultures d'algues ; elle a pu être vérifiée à plusieurs reprises pour les algues marines dans des systèmes en équilibre (Berland *et al.*, 1972) ; pour les bactéries on adopte une valeur de 500, et pour les organismes pluricellulaires on prend C/ATP = 50 à 100 (Karl *et al.*, 1978).

Ce rapport peut varier dans de très larges proportions selon l'état physiologique des cellules ou la carence du milieu en phosphore ; lorsque P est limitant l'ATP peut diminuer d'un facteur 10 et les C_p /ATP croissent fortement (Sakshaug et Holm-Hansen, 1977 ; Perry, 1976). Cavari (1976) a obtenu dans le lac Kinneret des valeurs pouvant atteindre 4985 (avec des populations à prédominance de péridiniens) et, en culture, des rapports voisins de 2400 qui peuvent devenir supérieurs à 15000 (Berland *et al.*, 1978). Il peut y avoir deux causes à ces variations : une diminution de la concentration cellulaire de l'ATP et/ou un accroissement du C_p cellulaire par assimilation superflue ("luxury uptake") de carbone.

La concentration cellulaire en ATP peut en effet varier (0,3 à 1,7%, Wildish, 1976 ; 0,5 à $4 \cdot 10^{-9}$ $\mu\text{g ATP} \cdot (\text{cellule})^{-1}$, soit un facteur de variation de 8 pour une culture de *Vibrio* sp., Hamilton et Holm-Hansen, 1967), et le rapport C_p/ATP n'est plus constant (Sakshaug et Holm-Hansen, 1977 ; Perry, 1976 ; Cavari, 1976 ; Berland *et al.*, 1978). Pendant la phase exponentielle de croissance la concentration en ATP croît, et C_p/ATP diminue. Par contre Paerl *et al.* (1976) trouvent que le rapport reste constant même en période de déficience en éléments nutritifs. Cependant les niveaux cellulaires d'ATP sont étroitement liés aux conditions extérieures : présence de métaux toxiques, variations de pH, apports de l'élément nutritif limitant (Brezonik et Patterson, 1972 ; Brezonik *et al.*, 1975). Cavari (1976) suggère que la concentration plus ou moins forte du milieu en P est la raison principale des variations de C/ATP , ce que Perry (1976) a montré sur des cultures carencées en phosphore (C/ATP supérieur à 2000). Wildish (1976) souligne que l'utilisation de facteurs de conversion fixes dans des eaux dont on ignore la taxonomie peut entraîner des erreurs allant jusqu'à un facteur 6 ; d'après Mayzaud et Tagushi (1979) l'utilisation d'un seul facteur de conversion est subordonnée à l'hypothèse que cette composition taxonomique reste constante dans le temps. On peut donc s'attendre à ce que l'on ait un rapport C_p/ATP variable dans les eaux saumâtres de la lagune Ebrié où les salinités varient de 0 à 35‰, où l'on observe des déficiences en P (extrémités occidentales et orientales) ou en N (zones intermédiaires, Dufour *et al.*, 1981), ou des surabondances en P (baies urbaines eutrophes), et par conséquent où les populations ont des compositions taxonomique et chimique différentes selon la zone considérée.

Cas de la lagune Ebrié :

Si l'on utilise le rapport $C/\text{ATP} = 250$ on obtient des valeurs de C vivant beaucoup trop faibles : quelques pour-cents dans la zone extrême occidentale qui est pourtant l'une des zones les plus productives (Pagès *et al.*, 1981a). On obtient des rapports $C_p \text{ total}/\text{ATP}$ extrêmement élevés (supérieurs à 20.000) que la seule présence de particules inertes ne saurait expliquer.

On peut envisager au moins cinq hypothèses :

1° - Le rapport C/ATP de 250 en mer, de 276 dans les eaux douces (Paerl et Williams, 1976) est trop faible pour les organismes d'eau saumâtre tropicale. Effectivement il n'y a aucune raison, a priori, pour que le rapport de 250, qui est de plus un rapport moyen, soit applicable en zone tropicale. Des cultures in situ ont donc été faites pour déterminer un rapport plus adapté (cf. infra).

2° - L'extraction de l'ATP est incomplète ou biaisée comme nous l'avons vu précédemment ; rappelons les trois points importants :

- a) la température d'extraction doit rester la plus voisine possible de 100°C ;
- b) la présence de nombreuses particules en suspension, comme c'est le cas en lagune Ebrié, perturbe l'extraction par adsorption ;
- c) l'extraction est incomplète lorsque la biomasse recueillie sur le filtre est trop importante.

Dans tous les cas il y a sous-estimation de la quantité d'ATP.

3° - Il y a une lyse des cellules sur le filtre entraînant une déperdition de l'ATP car les cellules subissent un "stress" dû à la filtration et il est possible qu'il y ait un réarrangement des nucléotides triphosphates, entraînant également une diminution d'ATP (Jones et Simon, 1977 ; Rieman, 1979).

4° - Certaines zones de la lagune sont pauvres en éléments nutritifs et en particulier déficitaires en P, ce qui entraîne un déséquilibre des cellules en P par rapport à C et N : dans les zones extrême-ouest et est on observe des C_p/P_p voisins de 300. D'autre part dans les eaux pauvres en P on observe fréquemment une absorption superflue ("luxury uptake") de carbone (Lehman, 1976) qui provoquerait un accroissement du rapport C_p/ATP .

5° - Dernière hypothèse : La proportion de matières détritiques (inférieures à 200 μ m) est importante et le C_p vivant est surestimé. La part du tripton est loin d'être négligeable en lagune où les faibles profondeurs favorisent la remise en suspension des sédiments. En outre les fortes précipitations tropicales accroissent rapidement le débit des rivières dont les eaux se chargent fortement de matières en suspension.

Il est probable que les cinq causes interviennent simultanément.

3 - DETERMINATION DU RAPPORT DE CONVERSION C_p/ATP POUR LA LAGUNE EBRIE

Les déterminations de C_p/ATP ont été effectuées dans la Baie de Biétri (zone d'estuaire), baie eutrophe où le phosphore est surabondant. Des incubations de phytoplancton à partir de populations naturelles ont été faites in situ dans des sacs à dialyse ; ceux-ci, soigneusement lavés et stérilisés, sont remplis d'eau de lagune filtrée sur $0,5 \mu m$, puis ensemencés par un petit volume d'eau de lagune (tamisée sur $200 \mu m$) ; une autre série d'incubations, suivant le même principe, est faite dans des récipients en verre. Les temps d'incubation variaient de 2 à 4 jours, permettant un développement des populations phytoplanctoniques et bactériennes exemptes de détritrus.

Cette méthode permet d'avoir un C_p/ATP proche de celui d'une population naturelle, bien qu'il soit probable que le développement de certaines espèces soit privilégié par rapport à d'autres.

La valeur moyenne de C_p/ATP obtenue ainsi est voisine de 350 (moyenne de 4 séries d'incubations ; $\sigma = 32$).

L'utilisation de cette valeur 350 déterminée expérimentalement dans une zone où P n'est pas limitant ne peut donc se faire, en toute rigueur, que dans la partie centrale de la lagune, les extrémités orientales et occidentales représentant les situations extrêmes (déficiences en phosphore et salinités très faibles, d'où des populations phytoplanctoniques différentes (Iltis, com. pers.). Il serait souhaitable de déterminer les rapports C_p/ATP pour chacune des régions caractéristiques de la lagune par cette méthode.

BIBLIOGRAPHIE

- AZAM, F. et HODSON, R.E., 1977 - Dissolved ATP in the sea and its utilisation by marine bacteria.
Nature, vol.267 : 696-698.

- BERLAND, B., BONIN, D., LABORDE, P. et MAESTRINI, S., 1972 - Variations de facteurs estimatifs de la biomasse et en particulier de l'ATP chez plusieurs algues marines planctoniques.
Mar. Biol., 13 (4) : 338-345.
- BERLAND, B., BONIN, D. et MAESTRINI, S., 1978 - Facteurs limitant la production primaire des eaux oligotrophes d'une aire côtière méditerranéenne (Calanque d'En-Vau, Marseille).
Int. Revue ges. Hydrobiol., 63 (4) : 501-531.
- BREZONIK, P.L. et PATTERSON, J.W., 1972 - Activated sludge. ATP : effects of environmental stress.
J. sanit. Engrg. Div., Amer. Soc. Civil Engrs., 97 : 813-824.
- BREZONIK, P.L., B'OVNE, F. et FOX, J., 1975 - Application of ATP to plankton biomass and bioassay studies.
Water Res., 9 (2) : 155-162.
- CAVARI, B., 1976 - ATP in Lake Kinneret : Indicator of microbial biomass or of phosphorus deficiency.
Limnol. Oceanogr., 21 (2) : 231-236.
- DUFOUR, Ph., LEMASSON, L. et CREMOUX, J.L., 1981 - Contrôle nutritif de la biomasse du seston dans une lagune tropicale de Côte d'Ivoire. II. Variations géographiques saisonnières.
J. exp. mar. Biol. Ecol. (sous presse).
- FRICHKNECHT, K. et SCHNEIDER, K., 1979 - An improved bioluminescence ATP analysis for extraction-resistant algal cells.
Arch. Hydrobiol., 87 (1) : 19-36.
- FRONTIER, S., 1972 - Calcul de l'erreur sur un comptage de zooplancton.
J. exp. mar. Biol. Ecol., vol.8 : 121-132.
- FRONTIER, S., 1973 - Etude statistique de la dispersion du zooplancton.
J. exp. mar. Biol. Ecol., vol.12 : 229-262.
- HAMILTON, R. et HOLM-HANSEN, O., 1967 - ATP content of marine bacteria.
Limnol. Oceanogr., 12 : 319-324.
- HERBLAND, A. et PAGES, J., 1975 - ATP dans le dôme de Guinée. Distribution verticale et signification écçlogique.
Cah. ORSTOM, sér. Océanogr., XIII (2) : 163-169.
- HOLM-HANSEN, O., 1970 - ATP levels in algal cells as influenced by environmental conditions.
Plant & Cell Physiol. 11 : 689-700.
- HOLM-HANSEN, O. et BOOTH, C., 1966 - The measurement of ATP in the ocean and its ecological significance.
Limnol. Oceanogr. 11 : 510-519.

- JONES, J.G. et SIMON, B.M., 1977 - Increased sensitivity in the measurement of ATP in freshwater samples with a comment on the adverse effect of membrane filtration.
Freshw. Biology, 7 : 253-260.
- KARL, D. et LAROCK, P., 1975 - ATP measurements in soil and marine sediments.
J. Fish. Res. Bd. Canada, 32 (5) : 599-607.
- KARL, D.M., HAUGNESS, J.A., CAMPBELL, L. et HOLM-HANSEN, O., 1978 - Adenosine nucleotide extraction from multicellular organisms and beach sand : ATP recovery, energy charge and determination of C/ATP ratios.
J. exp. mar. Biol. Ecol., 34 : 163-181.
- KNUDSEN, J.G. et KATZ, D.L., 1954 - Fluid dynamics and heat transfer.
University of Michigan Press, Mich. 243 pp.
- LEHMAN, J., 1976 - Photosynthetic capacity and luxury uptake of C during Phosphate limitation in *Pediastrum duplex* (chlorophyceae).
J. Phycol. 12 : 190-193.
- LEMASSEON, L., PAGES, J., DUFOUR, Ph. et CREMOUX, J.L., 1981 - Matière organique particulaire et biomasse dans une lagune tropicale.
Rev. Hydrobiol. Trop., ORSTOM (sous presse).
- MAYZAUD, P. et TAGUCHI, S., 1979 - Spectral and biochemical characteristics of the particulate matter in Bedford Basin.
J. Fish. Res. Bd. Canada, 36 (2) : 211-218.
- PAERL, H., TILZER, M. et GOLDMAN, Ch., 1976 - Chlorophyll a versus ATP as algal biomass indicators in lakes.
J. Phycol. 12 (2) : 242-246.
- PAERL, H. et WILLIAMS, N., 1976 - The relation between ATP and microbial biomass in diverse aquatic ecosystems.
Int. Rev. ges. Hydrobiol., 61 (5) : 659-664.
- PAGES, J., LEMASSEON, L. et DUFOUR, Ph., 1981a - Primary production measurements in a brackish tropical lagoon. II. Effect of light, as studied at some station by the ¹⁴C method.
Rev. Hydrobiol. Tropicale, 14 (1) : sous presse.
- PAGES, J., LEMASSEON, L. et DUFOUR, Ph., 1981b - Variabilité des évaluations du seston dans une lagune tropicale.
Rev. Hydrobiol. Tropicale, 14 (1) : sous presse.
- PERRY, M., 1976 - Phosphate utilization by an oceanic diatom in P-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pacific.
Limnol. Oceanogr., 21 (1) : 88-107

- PERRY, V.B., BOSWELL, J.T. et STANFORD, J.A., 1979 - Critical problems with extraction of ATP for bioluminescence assay of plankton biomass. *Hydrobiologia*, 65 (2) : 155-163.
- RIEMANN, B.O., 1979 - The occurrence and ecological importance of dissolved ATP in fresh water. *Fresh. Biol.*, 9 : 481-490.
- SAKSHAUG, E. et HOLM-HANSEN, O., 1977 - Chemical composition of *Skeletonema costatum* and *Favlova lutheri* as a function of nitrate phosphate and iron-limited growth. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 29 : 1-34.
- SUTCLIFFE, V., ORR, E. et HOLM-HANSEN, O., 1976 - Difficulties with ATP measurements in inshore waters. *Limnol. Oceanogr.*, 21 (2) : 145-149.
- WILDISH, D., 1976 - Determination of ATP in estuarine water and sediments by firefly bioluminescence assay. *Rap. Tech. 649 - Ministère de l'environ. Station Biol. St. Andrews N.B.*

